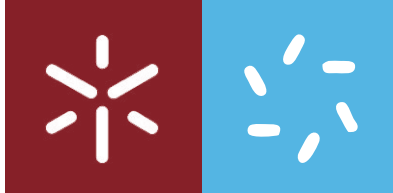


Universidade do Minho
Escola de Ciências

Marta Manuela Lobo Fernandes

Avaliação da toxicidade das nanopartículas de dióxido de titânio, dióxido de titânio dopado com érbio e ferrites de cobalto em fungos aquáticos



Universidade do Minho

Escola de Ciências

Marta Manuela Lobo Fernandes

**Avaliação da toxicidade das nanopartículas
de dióxido de titânio, dióxido de titânio
dopado com érbio e ferrites de cobalto em
fungos aquáticos**

Tese de Mestrado

Mestrado em Ciências e Tecnologias do Ambiente -

Ramo Energia

Trabalho efetuado sob a orientação do

Professor Doutor Senentxu Lanceros-Mendez

e da

Professora Doutora Fernanda Maria Fraga

Mimoso Gouveia Cássio

Abril de 2017

Declaração

Nome: Marta Manuela Lobo Fernandes

Endereço eletrónico: martinhamfl@hotmail.com

Cartão de cidadão: 13933493 9 ZY8

Título da dissertação: Avaliação da toxicidade das nanopartículas de dióxido de titânio, dióxido de titânio dopado com érbio e ferrites de cobalto em fungos aquáticos

Orientador: Professor Doutor Senentxu Lanceros-Mendez

Co-orientador: Professora Doutora Fernanda Maria Fraga Mimoso Gouveia Cássio

Ano de conclusão: 2017

Designação do Mestrado: Ciências e Tecnologias do Ambiente- Ramo Energia

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE

Universidade do Minho, 07 de abril de 2017

(Marta Fernandes)

Agradecimentos

Quero prestar o meu mais profundo agradecimento ao Professor Doutor Senentxu Lanceros-Méndez, por tão bem me ter recebido, pelas palavras de conforto e a toda a “família” ESM pela integração e momentos bem passados.

Um sincero agradecimento à Professora Doutora Fernanda Cássio, na qualidade de minha coorientadora, e à Professora Doutora Cláudia Pascoal, pela forma como me receberam no seu grupo.

Depois, quero agradecer do fundo do meu coração ao Pedro Martins, pela paciência e sabedoria, fazendo-me sempre ver que em Ciência nem tudo é perfeito, nem tudo corre como esperado.

Como não podia deixar de ser, ao Arunava Pradhan pela sua incansável paciência, agradeço do fundo do meu coração. Agradeço não só todo o tempo despendido com a minha tese, mas tudo aquilo que fui aprendendo ao longo destes meses, e que pretendo levar para a vida!

À Isabel Fernandes, pelos conselhos e ajuda nas traduções e a todas as pessoas do Laboratório da Biodiversidade que me acolheram de braços abertos e me foram ajudando de alguma forma. Em especial, à Rita Carvalho e à Rita Rodrigues, para quem não tenho palavras para agradecer toda a ajuda no laboratório, a dedicação e a amizade demonstradas. A todos, o meu sincero obrigada!

Ao Jacinto, Diogo, Ricardo e Miguel, pelo companheirismo, amizade e longos almoços, muito obrigada!

Ao Ezequiel, a minha profunda gratidão, por todas as palavras de conforto, pela amizade, dedicação, companheirismo e por não me deixares desistir à primeira dificuldade. Foste o meu grande pilar ao longo destes anos e espero que o continues a ser!

À minha querida família, que sem ela nunca teria chegado até aqui, o meu sincero muito obrigada!

Aos que já partiram, o meu mais profundo agradecimento, por me incentivarem a nunca desistir e a ser uma pessoa melhor.

E a todas as pessoas que me ajudaram e contribuíram para o meu sucesso, muito obrigada!

Resumo

O forte desenvolvimento nas indústrias baseadas em nanotecnologia nos últimos anos acelerou o ritmo de produção e do uso dos nanomateriais. Com o uso acelerado das nanopartículas (NPs) as águas naturais servirão, certamente, de reservatório para a descarga dos nanomateriais, levando a uma preocupação ainda maior no que diz respeito à sua interação com o meio ambiente e com os organismos com potenciais efeitos negativos nos processos dos ecossistemas associados.

As comunidades de fungos aquáticos desempenham um papel fundamental na cadeia alimentar, transferindo carbono e energia da matéria orgânica (MO) das plantas para níveis tróficos superiores.

As NPs de TiO_2 têm sido utilizadas em fotocatalise para purificação de águas residuais por decomposição de compostos orgânicos. As NPs de CoFe_2O_4 possuem características atrativas para aplicações biomédicas e magnetoelétricas, tais como sensores inteligentes, atuadores e aparelhos microeletrônicos de alta frequência. Em ambos os casos, devido às suas características singulares estes nanomateriais têm vindo a ser cada vez mais utilizados na indústria, como tal, crescentes quantidades serão libertadas para os ecossistemas aquáticos.

O impacto das NPs de dióxido de titânio (TiO_2), TiO_2 dopado com érbio (Er: TiO_2) e as ferrites de cobalto (CoFe_2O_4) foi avaliado expondo em microcosmos folhas de castanheiro colonizadas por micróbios a 5 concentrações (0.25, 1, 10, 50 e 150 mg/L) de NPs. A taxa de decomposição foliar e a biomassa fúngica não foram afetadas significativamente pelas NPs. As enzimas antioxidantes do ascorbato envolvidas no ciclo da glutathione mostraram padrões de resposta semelhantes. As atividades da catalase (CAT), da glutathione peroxidase (GPx) e da glutathione S-transferase (GST) aumentaram de forma dependente da dose indicando stress oxidativo induzido pelas NPs. No entanto, as respostas destes biomarcadores de stress foram mais fortes para as NPs de TiO_2 e menos pronunciadas para as de Er: TiO_2 . Isto indica que as NPs de Er: TiO_2 foram as menos tóxicas entre as NPs testadas para as comunidades de fungos aquáticos. A exposição subletal aguda de invertebrados trituradores, mostrou que as NPs de Er: TiO_2 e as CoFe_2O_4 suspensas em água são mais tóxicas do que as NPs fornecidas via alimentação com discos foliares contaminados. O comportamento alimentar dos invertebrados na presença do Er: TiO_2 e das CoFe_2O_4 , na decomposição da folhada, indicou que estas NPs têm um efeito subletal mais acentuado quando comparadas com o TiO_2 .

Abstract

The strong development in nanotechnology-based industries in recent years has accelerated the production and use of the nanomaterials. With the rapid use of nanoparticles (NPs), natural waters are likely to serve as reservoirs for nanomaterials discharged into the environment, leading to a great concern about their potential interactions with aquatic biota and associated ecosystem processes. Aquatic fungal communities play a key role in stream detritus foodweb by transferring carbon and energy from plant-litter to higher trophic levels.

The TiO_2 NPs has been used in photocatalysis to purify wastewater associated with the decomposition of organic compounds. The CoFe_2O_4 NPs have attractive features for biomedical and magnetoelectric applications such as smart sensors, actuators and high frequency microelectronic devices. In both cases, due to their unique characteristics these nanomaterials have been increasingly used in the industry, as such, increasing quantities will be released to aquatic ecosystems.

The impacts of TiO_2 , doped TiO_2 and CoFe_2O_4 NPs, were assessed by exposing microbially colonized leaves to 5 concentrations (0.25, 1, 10, 50 and 150 mg/L) of NPs in microcosms. Leaf decomposition rate and fungal biomass were not affected significantly by the tested NPs. The antioxidant enzymes involved in the ascorbate-glutathione cycle showed similar response patterns. The activities of catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione S-transferase (GST) increased in a dose-dependent manner indicating NP-induced oxidative stress. However, the responses of these stress biomarkers were stronger against TiO_2 NPs (non-doped) than to TiO_2 NPs. This indicates that the erbium doped TiO_2 NPs were the less toxic among the all tested NPs towards aquatic fungal communities.

The acute sublethal exposure of invertebrate shredders showed that Er: TiO_2 NPs and CoFe_2O_4 supplied via water are more toxic than exposure of animals to leaves contaminated with NPs. The feeding behaviour of the invertebrates to the exposure to Er: TiO_2 and CoFe_2O_4 indicated that these NPs have a more pronounced sublethal effect when compared with TiO_2 .

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	i
Abstract	iii
Índice	iv
Índice de figuras	vi
Lista de tabelas	viii
Abreviaturas	ix
1. Introdução.....	2
1.1. Riscos ecológicos das nanopartículas.....	4
1.2. Aplicações das nanopartículas	6
1.3. Importância de indicadores ecotoxicológicos	8
1.4. Objetivos e estrutura da tese.....	9
2. Caracterização das nanopartículas	12
2.1. Introdução	12
2.2. Material e Métodos.....	17
2.3. Resultados	18
2.3.1. Dispersão dinâmica da luz.....	18
2.3.2. Potencial zeta	20
2.3.3. Difração de raios-X	21
2.3.4. Microscopia eletrônica de transmissão.....	23
2.4. Discussão.....	25
3. Impactos das nanopartículas sobre a decomposição do material vegetal nos rios	29
3.1. Introdução	29
3.2. Material e Métodos.....	30
3.2.1. Colonização microbiana no rio	30
3.2.2. Exposição em microcosmos	31
3.2.3. Biomassa fúngica	32
3.2.4. Perda de massa foliar.....	32
3.2.5. Enzimas antioxidantes.....	33
3.2.6. Análise estatística.....	34
3.3. Resultados	34
3.4. Discussão.....	38
4. Efeitos subletais agudos das nanopartículas em trituradores de água doce	42
4.1. Introdução	42
4.2. Material e Métodos.....	43
4.2.1. Colheita de invertebrados e exposição às nanopartículas	43

4.2.2.	Taxa de consumo de folhas por invertebrados e micróbios	43
4.2.3.	Análise estatística.....	44
4.3.	Resultados	45
4.4.	Discussão.....	49
5.	Conclusão geral e perspectivas futuras	52
6.	Referências bibliográficas.....	55

Índice de figuras

Figura 2.1 Diâmetro hidrodinâmico médio de uma nanopartícula através da técnica de DLS (Adaptado de Instruments 2013).....	13
Figura 2.2 Representação esquemática das várias camadas associadas a uma partícula em suspensão (Adaptado de Delgado (2013))	14
Figura 2.3 Esquema representativo da lei de Bragg (Adaptado de Weller (1994)).....	15
Figura 2.4 Esquema representativo da Microscopia Eletrônica de Transmissão (Adaptado de http://micro-esalq.blogspot.pt/2012/03/aula-2-microscopia-eletronica.html)	17
Figura 2.5 Histograma do tamanho hidrodinâmico médio das nanopartículas de CoFe ₂ O ₄ , Er: TiO ₂ e TiO ₂ . Valores médios obtidos com seis medições consecutivas após quatro minutos de tempo de estabilização à temperatura de 22°C.....	19
Figura 2.6 Potencial ζ das nanopartículas de CoFe ₂ O ₄ de TiO ₂ e de Er: TiO ₂ . Valores médios obtidos com seis medições consecutivas após quatro minutos de tempo de estabilização à temperatura de 22°C para os valores de pH 3, 5, 7, 9 e 11	20
Figura 2.7 Difratoograma de raios-x das amostras das NPs de TiO ₂	22
Figura 2.8 Difratoograma de raios-x das amostras das NPs de Er: TiO ₂	22
Figura 2.9 Difratoograma de raios-x das amostras das NPs de CoFe ₂ O ₄	23
Figura 2.10 Imagem de microscopia eletrônica de transmissão das NPs de Er: TiO ₂	23
Figura 2.11 Imagem de microscopia eletrônica de transmissão das NPs de TiO ₂	24
Figura 2.12 Imagens de microscopia eletrônica de transmissão das NPs de CoFe ₂ O ₄	24
Figura 3.1 Fotografia do local onde se colocaram os sacos para colonização das folhas por fungos aquáticos.....	31
Figura 3.2 Discos foliares nos microcosmos em agitação a longo de 21 dias com os diferentes tipos de NPs e diferentes concentrações	32
Figura 3.3 Taxa de decomposição foliar para as diferentes NPs de TiO ₂ (TP), Er: TiO ₂ (TD) e de CoFe ₂ O ₄ (Co). C = controlo, TP1=0,25 mg/L, TP2= 1 mg/L, TP3=10 mg/L, TP4= 50 mg/L e TP5=150mg/L; Co1=0,25 mg/L, Co2=1 mg/L, Co3=10 mg/L, Co4=50 mg/L e Co5=150mg/L; TD1=0,25 mg/L, TD2=1 mg/L, TD3=10 mg/L, TD4=50 mg/L e TD5=150mg/L, M+EPM, n=3.	35
Figura 3.4 Concentração de ergosterol como medida da biomassa fúngica das diferentes NPs de TiO ₂ (TP), Er: TiO ₂ (TD) e de CoFe ₂ O ₄ (Co). C=controlo, C1=0,25 mg/L, C2=1mg/L, C3=10 mg/L, C4=50 mg/L e C5=150 mg/L, M+EPM, n=3.	36
Figura 3.5 Atividade enzimática da Glutathione S-Transferase em folhas expostas às diferentes NPs de TiO ₂ (TP), Er: TiO ₂ (TD) e de CoFe ₂ O ₄ (Co), onde NP1=0,25 mg/L, NP2=1 mg/L, NP3=10 mg/L, NP4=50 mg/L e NP5=150 mg/L. M+EPM, n=3	37

Figura 3.6 Atividade enzimática da glutathione peroxidase em folhas expostas a TiO_2 (TP), Er: TiO_2 (TD) e de CoFe_2O_4 (Co). NP1=0,25 mg/L, NP2=1 mg/L, NP3=10 mg/L, NP4=50 mg/L e NP5=150 mg/L. M+EPM, n=3.....	37
Figura 3.7 Atividade enzimática da catalase para as diferentes NPs de TiO_2 (TP), Er: TiO_2 (TD) e de CoFe_2O_4 (Co). NP1=0,25 mg/L, NP2=1 mg/L, NP3=10 mg/L, NP4=50 mg/L e NP5=150 mg/L	38
Figura 4.1 (a) Local de recolha dos invertebrados; (b) sacos de malha fina para exposição microbiana; (c) microcosmo com a larva da família Sericostomatidae; (d) exposição em microcosmos para alimentação dos invertebrados	44
Figura 4.2 Taxa de consumo de folhas de castanheiro por invertebrados após 5 dias de exposição às NPs de TiO_2 , Er: TiO_2 e de CoFe_2O_4 na água. M+EPM, n=3.....	45
Figura 4.3 Taxa de consumo das folhas de castanheiro por invertebrados após 5 dias de exposição a NPs de TiO_2 , Er: TiO_2 e de CoFe_2O_4 nas folhas. M+EPM, n=3	46
Figura 4.4 Taxa de decomposição microbiana das folhas de castanheiro por invertebrados após 5 dias de exposição a NPs de TiO_2 , Er: TiO_2 e de CoFe_2O_4 na água. M+EPM, n=3	46
Figura 4.5 Taxa de decomposição microbiana das folhas de castanheiro por invertebrados após 5 dias de exposição a NPs de TiO_2 , Er: TiO_2 e de CoFe_2O_4 nas folhas, M+EPM, n=3	47
Figura 4.6 Taxa de consumo total das folhas de castanheiro por invertebrados após 5 dias de exposição a NPs de TiO_2 , Er: TiO_2 e de CoFe_2O_4 na água, M+EPM, n=3	48
Figura 4.7 Taxa de consumo total das folhas de castanheiro por invertebrados após 5 dias de exposição a NPs de TiO_2 , Er: TiO_2 e de CoFe_2O_4 nas folhas. M+EPM, n=3.....	48

Lista de tabelas

Tabela 3.1 Propriedades físico-químicas da água do rio Algeriz apenas com uma medição avaliadas <i>in situ</i>	32
---	----

Abreviaturas

CAT - catalase

cm - centímetros

Co - ferrites de cobalto

CoFe₂O₄ - ferrites de cobalto

DLS - Dynamic Light Scattering

DXR - difração de raios-X

EROS - espécies reativas de oxigênio

GPx - glutathione peroxidase

GST - glutathione S-transferase

HPLC - High Performance Liquid Chromatography

KeV - quilo elétron volt

KOH - hidróxido de potássio

KV - quilovolts

mA - miliamperes

TEM - Transmission Electronic Microscopy

mg/L - miligramas/Litro

mg - miligrama

mM - milimolar

M - molar

MO - Matéria Orgânica

MON - Matéria Orgânica Natural

nm - nanômetros

NMs - nanomateriais

NPMs - nanopartículas magnéticas

NP - nanopartícula

NPs - nanopartículas

Pdi - índice de polidispersão

ppm - partes por milhão

rpm - rotação por minuto

TD - dióxido de titânio dopado

TP - dióxido de titânio

UV - Ultravioleta

μg - micrograma

μL - microlitro

$\mu\text{S}/\text{cm}$ - microsiemens/centímetro

ζ - zeta

θ - teta

Capítulo 1

1. Introdução

O desenvolvimento tecnológico a que temos assistido nas últimas décadas permitiu que muitas indústrias produzissem e utilizassem grandes quantidades de nanomateriais (NMs) (Aitken et al. 2006). Os NMs estão presentes em diferentes setores como, os cosméticos (Perugini et al. 2002), as tintas antimicrobianas (Kägi et al. 2008), os tecidos (Zhang et al. 2009), na engenharia têxtil (Salata 2004), nos dispositivos eletrónicos (Luechinger et al. 2008) e ainda são muito utilizados em aplicações biomédicas e farmacêuticas, em terapia de cancro e genética, deteção de proteínas e engenharia de tecidos (Salata 2004).

As nanopartículas (NPs) podem ser de origem natural ou antropogénica. Relativamente às primeiras podem provir de poeiras vulcânicas, dispersas através do ar, e outras de alguns vírus. Já as de origem antropogénica são produzidas através das atividades humanas, como por exemplo: fumo do tabaco, combustão dos automóveis; confeção de alimentos; engenharia de nanopartículas, entre outros (Biswas and Wu 2005; Louro et al. 2013).

As nanopartículas encontram-se naturalmente no meio ambiente, mas a sua produção e o seu uso estão num ritmo acelerado e espera-se um crescimento ainda maior nas próximas décadas (Carnes and Klabunde 2003). Com o uso acelerado das NPs, os ecossistemas aquáticos servirão de reservatório para a descarga das NPs, levando a uma preocupação ainda maior no que diz respeito à sua interação com o meio ambiente (Kägi et al. 2008; Marquis et al. 2009; Maurer-Jones et al. 2009). As NPs, uma vez livres tendem a formar agregados que podem ficar cativos ou mesmo ser eliminados através da sedimentação, embora, quando agregados sejam menos móveis, mas podem ser absorvidos por filtradores ou animais bentónicos no ambiente aquático (Farré et al. 2009), afetando as comunidades biológicas e as suas funções (Johnson et al. 1996). Por outro lado, é possível que ocorra uma bioacumulação nas cadeias alimentares, apesar de, até então, não existirem dados concretos acerca deste assunto (Farré et al. 2009).

Nos ambientes aquáticos, juntamente com os detritívoros e as bactérias, os fungos atuam como mediadores do fluxo de energia e de nutrientes (Baldy et al. 2002; Barlocher 1992a; Gessner et al. 2007; Pascoal and Cássio 2004). Neste sentido, os fungos contribuem de forma vital para os ecossistemas aquáticos, já que são decompositores do material vegetal. Além disso, possuem uma grande capacidade de degradação de resíduos

persistentes compostos por carbono e nitrogénio, ácidos húmicos, entre outras substâncias (Bärlocher 1992b; Christensen 1989; Kjølner and Struwe 1992; Moore 1996).

Os fungos Ingold ou também hifomicetos aquáticos são constituídos por um grupo filogeneticamente heterogéneo pertencentes aos Filos *Ascomycota* e *Basidiomycota* (Ingold 1975) que se caracterizam por apresentar reprodução assexuada através da formação de conídios (Alexopoulos et al. 1996; Grandi 1999; Kirk et al. 2008). Estes fungos não são classificados tendo em conta os níveis taxonómicos habituais, assumindo-se apenas a existência de géneros e espécies (Kirk et al. 2008). Podem apresentar produção de estruturas assexuadas numa das fases do seu ciclo de vida e, noutros momentos, podem apresentar formação de estruturas sexuadas (Marvanová and Laichmanová 2007).

Os hifomicetos podem dividir-se em dois grupos, os hifomicetos aquáticos e os terrestres (Goh and Hyde 1996; Schoenlein-Crusius and Malosso 2007). Os hifomicetos aquáticos ocorrem predominantemente em ecossistemas aquáticos continentais ou em ambientes com acumulação de água, como solos encharcados (Ingold 1975; Pascoal et al. 2005b; Schoenlein-Crusius and Grandi 2003). Possuem adaptações morfológicas e fisiológicas que lhes permite a colonização e a decomposição foliar em sistemas lóticos (Suberkropp 1998). Os conídios hidrodinâmicos formados pelos hifomicetos possuem formas tetra radiadas ou multirradiadas e sigmóides que facilitam a flutuação (Ingold 1975) e o contacto com o substrato. Estes fungos apresentam grande importância na cadeia alimentar (Thomas 1996), pois contribuem para a palatabilidade da folhada constituindo uma fonte de alimento para os invertebrados detritívoros (Gessner et al. 1999), tornando-se uma importante ligação trófica entre a matéria vegetal e os macroinvertebrados (Laitung et al. 2002). Produzem enzimas extracelulares que permitem a maceração da folhada e são capazes de crescer em temperaturas baixas, como as de climas temperados durante a estação da queda da folha (Suberkropp 1984). Assim, os hifomicetos aquáticos apresentam um comportamento sazonal definido, ocorrendo predominantemente no final do verão e durante o outono, que coincide com as maiores concentrações de matéria orgânica nos ambientes aquáticos (Barlocher 1992a; Bärlocher 2009).

1.1. Riscos ecológicos das nanopartículas

A toxicidade de uma NP vai depender das suas características bem como da sua interação com os fatores bióticos e abióticos no meio ambiente, que irão determinar a sua biodisponibilidade e o seu comportamento (Handy et al. 2012). Por outro lado, deve-se considerar a forma como elas se encontram no ambiente ou nos organismos vivos, podendo apresentar-se livres ou aglomeradas (Schwab et al. 2011).

Diversos estudos têm revelado que a agregação de NPs diminui a sua toxicidade para os organismos (Bradford et al. 2009; Kvitek et al. 2009; Lok et al. 2007). Por outro lado, outros autores sugerem que a diminuição da toxicidade em função do tamanho das NPs só ocorre quando a principal via de entrada é a membrana celular (Ward and Kach 2009); já para os organismos em que a principal via é a ingestão há biodisponibilidade acrescida (Nogueira et al. 2013). No entanto, há que ter em conta que a agregação das NPs irá determinar o tamanho a que os organismos estarão expostos, influenciando a biodisponibilidade e a toxicidade (Nogueira et al. 2013). Outros autores revelam que quanto mais agregadas as NPs estiverem menor a área superficial específica, menor a biodisponibilidade e o potencial tóxico (Navarro et al. 2008).

Em estudos sobre NPs de sais de prata (Ag), há evidências de que estas sofrem facilmente transformações no meio ambiente alterando as suas propriedades, o seu transporte e a sua toxicidade (Levard et al. 2012), potenciando os efeitos tóxicos na saúde humana e no meio ambiente. Numa experiência com ratos *in vivo* mostrou que na presença de NPs de Ag de 60 nm, levou a alterações nos níveis de testosterona, de produção de esperma, no comportamento sexual e na concentração de espermatozoides (Mathias et al. 2015). Ainda relativamente a estudos com NPs de Ag (10 e 80 nm), os autores verificaram efeitos nocivos no desenvolvimento de peixes, com deformação na medula espinhal, arritmia cardíaca e na sobrevivência. As NPs de Ag também se podem acumular nas brânquias e no tecido hepático, afetando a respiração dos peixes em águas com baixos níveis de oxigénio induzindo o stress oxidativo (Asharani et al. 2008; Bilberg et al. 2010; Scown et al. 2010; Yeo and Pak 2008).

Segundo Karlsson et al. (2008), algumas NPs, como por exemplo: CuO, TiO₂, ZnO, CuZnFe₂O₄, Fe₃O₄, Fe₂O₃, evidenciaram efeitos tóxicos, nomeadamente danos ao nível do DNA e *stress* oxidativo.

As NPs de CuO apresentam uma toxicidade relativamente elevada para a espécie *Daphnia magna* através da libertação de iões de Cu²⁺ da superfície das NPs. No mesmo

sentido, um outro estudo mostra que estas mesmas NPs se tornam mais tóxicas quando em contacto com o meio aquático, que promove a sua agregação (Heinlaan et al. 2011; Rossetto 2012).

As NPs metálicas e os iões metálicos (NPs CuO: 0, 100, 200 e 500 ppm; NPs Ag: 0, 100 e 300 ppm) também revelaram efeitos sobre microrganismos decompositores do material vegetal nos rios. Concluiu-se que estas NPs tiveram mais impacto sobre a esporulação fúngica do que na diversidade fúngica. Além disso, estas NPs e os iões metálicos têm implicações ecológicas porque se a produção fúngica for afetada, pode ter impacto na dispersão fúngica e na sua sobrevivência, o que por sua vez, afetará os invertebrados trituradores da folhada submersa (Pradhan et al. 2011).

Relativamente a estudos de NPs de TiO₂, Zhu et. al (2009) e (2010) mostraram que houve acumulação, em 48 horas, de NPs de TiO₂ no intestino de *Daphnia magna*, mas sobretudo, após 72 horas houve maior acumulação destas NPs no intestino do animal. Numa exposição crónica com baixas concentrações, as NPs de TiO₂ inibiram o crescimento e a reprodução da *D. magna*. Num teste realizado com a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) numa concentração de 1 mg/L de NPs de TiO₂ não houve evidências de toxicidade, mas foram detetados efeitos subletais, como alterações bioquímicas e respiratórias e patologias de órgãos internos no peixe (Federici et al. 2007). Noutro teste realizado com a mesma espécie de peixe, em que se adicionou 10 e 100 mg/Kg de NPs de TiO₂ no alimento ao longo de 2 meses não houve influência das NPs nem no crescimento nem nas características hematológicas (Ramsden et al. 2009). Scown et al. (2009), mostraram que quando injetaram a truta arco-íris via intravenosa com uma dose de 1,3 mg/ kg de NPs de TiO₂ foram detetadas baixas quantidades de TiO₂ no fígado.

Poucos são os estudos que testaram a toxicidade do érbio em espécies de animais e ou plantas. No entanto, numa investigação, da qual o érbio fez parte, com o objetivo de estabelecer a relação entre a abundância dos lantanídeos, na água do mar e a sua toxicidade em algas marinhas revelou que estes têm efeitos tóxicos nas algas marinhas. As concentrações mais elevadas (29,04 $\mu\text{mol L}^{-1}$) resultaram numa redução em 50% do crescimento da *Skeletonema costatum* quando comparadas com o controlo (0 $\mu\text{mol L}^{-1}$), após 96 horas. Embora diferentes elementos dos lantanídeos tenham toxicidades diferentes em organismos vivos de nível trófico superior, no entanto, estes têm o mesmo efeito de toxicidade em organismos celulares (Tai et al. 2010). Noutro estudo, onde se avaliaram os efeitos tóxicos crónicos dos compostos de disprósio, hólmio e érbio administrados em ratos em três doses de 0,01, 0,1 e 1% de cada composto ao longo de 12

semanas, mostrou haver danos em vários órgãos após a alimentação daqueles compostos. Em todos os órgãos estudados, os três compostos exibiram nos animais um efeito depressivo e produziram a morte por paralisia respiratória associada ao colapso cardiovascular (Haley et al. 1966).

Relativamente às ferrites de cobalto, existem poucos estudos que abordam a toxicidade destas nanopartículas. Ahmad et al. (2015a) testaram a toxicidade aguda das NPs de CoFe_2O_4 em embriões de peixe-zebra (*Danio rerio*) com concentrações de 0, 10, 62,5, 125, 250, 500 μM ao longo de 96 horas. Os resultados mostraram que as NPs de CoFe_2O_4 induzem toxicidade aguda, atraso no desenvolvimento, apoptose, atraso na eclosão, batimento cardíaco instável, flexão da cauda e da medula espinhal. Os resultados também sugeriram que estas NPs causam mudanças comportamentais nos embriões de peixes-zebra tornando-os sésseis na parte inferior. Estas NPs também induziram o stress físico, que resultou no movimento reduzido dos embriões com atraso na eclosão e o stress oxidativo, que afetaram as membranas através da apoptose na região da cabeça, coração e cauda. Estes resultados evidenciaram um potencial risco das NPs de CoFe_2O_4 para o ambiente e sugerem uma avaliação completa do risco em aplicações biológicas. Noutro estudo, foram testadas as concentrações de 0, 6,3, 12,5, 25, 50 e 100 mg/L de CoFe_2O_4 , com o objetivo de estudar a interação, a adaptação e o stress oxidativo causado pelas NPs em algas unicelulares (*Chlorella vulgaris*). Os resultados mostraram que esta alga foi muito sensível à concentração mais baixa. A adsorção destas NPs provocou danos oxidativos graves através da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que levou à aceleração do processo de peroxidação lipídica e desnaturação de enzimas antioxidantes resultando na destruição do sistema de defesa antioxidante. Os autores sugerem que os resultados mostram um potencial risco das NPs de CoFe_2O_4 para o ambiente aquático (Ahmad et al. 2015b).

1.2. Aplicações das nanopartículas

O reduzido tamanho das NPs e as suas propriedades físico-químicas são muitas vezes a razão para a sua crescente utilização (Marquis et al. 2009), conferindo-lhes propriedades elétricas, magnéticas, óticas e mecânicas únicas (McWilliams 2006) analogamente a materiais com a mesma composição físico-química mas com dimensões maiores (Oberdörster 2010; SCENIHR 2009). Estas propriedades únicas dos NMs têm contribuído significativamente para o desenvolvimento e produção em quantidades

significativas de uma geração de produtos inovadores contendo NMs, com uma grande diversidade de aplicações em áreas como a eletrônica, os veículos automóveis, os têxteis, a cosmética, a biomedicina (Wijnhoven et al. 2011).

Na área automóvel, as NPs de Platina (Pt), Paládio (Pd) e Ródio (Rh), são já utilizadas há décadas em conversores catalíticos para tratar os gases do escape do motor. O desenvolvimento de métodos mais eficazes de síntese de NPs e ferramentas de caracterização, originou melhores materiais catalíticos. Por exemplo, o Fe/Pt e o Fe/Pd evidenciaram eficiência na degradação de contaminantes orgânicos ambientais (Adams, Captain et al. 2005; Sato and Donaldson (1998).

Na área têxtil, os NMs são muito utilizados para produção de lençóis, roupa, tecidos impermeabilizados para decoração. Na área da biomedicina, os NMs são usados em sistemas de terapêutica dirigida, sistemas de diagnóstico, medicina regenerativa em pele ou osso artificial, ligaduras, aparelhos de audição, próteses ortopédicas (Wijnhoven et al. 2011).

Com uma grande diversidade de setores económicos a recorrerem ao uso de NMs é evidente que a sua libertação levará a um aumento drástico da presença de NPs nas estações de tratamento de águas residuais (ETAR) (Benn and Westerhoff 2008; Mueller and Nowack 2008). Uma vez libertadas nas águas residuais, estarão em contacto com o matéria orgânica, que afetará o comportamento das NPs (Harrison, Harradet al. 2003) e poderá atuar como fator de dispersão (Brar et al. 2010; Liang et al. 2010). Uma vez que estes NMs não são eficazmente removidos nas ETAR, prevê-se que grandes quantidades sejam gradualmente libertadas nas descargas de águas residuais para os efluentes (Kaegi et al. 2011; Wang et al. 2012). No entanto, muitos NMs tendem a formar grandes agregados e não é claro que estes possuam o mesmo potencial tóxico e biodisponibilidade como quando estão desagregados. Tal facto dependerá das características físicas e químicas bem como das substâncias com as quais os NMs interagem ao entrar no ambiente aquático (Boxall et al. 2007).

No ambiente aquático e terrestre, a matéria orgânica natural desempenha um papel significativo no transporte e no destino das NPs devido à tendência para a absorção coloidal e agregação através de reações hidrofóbicas. No entanto, a adsorção de sólidos de origem biológica, provenientes de águas residuais pode ser prejudicial na presença de surfactantes da descarga de efluentes (Hyung et al. 2007; Kiser et al. 2010). Apesar das lamas ativadas nas ETAR serem utilizadas para reduzir as concentrações de nutrientes,

de sólidos em suspensão, de metais e de químicos das águas residuais (Sheng et al. 2008), os surfactantes podem movimentar poluentes orgânicos e metais que normalmente são insolúveis na água e no solo (Cserhádi et al. 2002; Dentel et al. 1993; Warne and Schifko 1999). Além disso, a eficiência das ETARs pode ser reduzida com grandes quantidades de surfactantes, levando a que estes compostos reduzam a tensão superficial, podendo alterar a floculação, a compactação e a desidratação das lamas (Dentel et al. 1993). As concentrações de surfactantes no ambiente podem também ser reduzidas pela adsorção aos sedimentos e pela biodegradação por comunidades bacterianas endógenas, todavia, com uma taxa de degradação em comparação às estações de tratamento menor (Eichhorn et al. 2002).

Este trabalho vai estudar a toxicidade das NPs de TiO_2 puras e dopadas bem como as ferrites de cobalto (CoFe_2O_4). Em relação às primeiras, existem diversas aplicações nas mais diversas áreas, nomeadamente superfícies auto-limpantes (Ruot et al. 2009), fotocatalise (Fujishima et al. 2000; Hoffmann et al. 1995), produção de hidrogénio (Reddy et al. 2016), entre outras. Na área dos cosméticos, a principal aplicação dos NMs incide nos protetores solares, com o uso de TiO_2 (14 nm) e óxido de zinco (ZnO) (30-200 nm) para a absorção da radiação UV nociva à pele e, de modo a apresentar uma emulsão transparente requerem tamanho nanométrico (Nohynek et al. 2007; Paschoalino et al. 2010). Relativamente às ferrites de cobalto estas têm vindo a ser muito utilizadas no desenvolvimento de novos materiais para andaimes, engenharia de tecidos, aplicações biomédicas, tais como hipertermia magnética, condução de fármacos, ressonância magnética, sensores e atuadores e biossensores (Amiri and Shokrollahi 2013; Baldi et al. 2007; Sajjia et al. 2010).

1.3. Importância de indicadores ecotoxicológicos

Existe uma diversidade de organismos teste, de vários níveis tróficos, que podem ser utilizados em testes de toxicidade. Os mais utilizados incluem plantas (algas), animais invertebrados (crustáceos) e espécies de peixes o que permite determinar os efeitos tóxicos a diversos níveis tróficos (Larsen et al. 1997).

Os organismos escolhidos como organismos teste devem seguir alguns critérios: devem ser sensíveis ao tóxico, representar as populações nativas que são ecologicamente importantes, devem ser de fácil obtenção e manutenção laboratorial (Larsen et al. 1997).

Os hifomicetos aquáticos são geralmente encontrados em rios ou ribeiros com águas limpas, bem oxigenadas e moderadamente turbulentas (Ingold 1975). Por outro lado, também podem ocorrer em águas com propriedades limnológicas diferentes (Au et al. 1992; Schoenlein-Crusius et al. 2009). Ainda assim, a riqueza destes fungos tem sido usada como indicador do estado de conservação do ambiente aquático (Gessner et al. 1991).

1.4. Objetivos e estrutura da tese

Os objetivos deste trabalho centraram-se em: avaliar a toxicidade das nanopartículas de dióxido de titânio (TiO_2), dióxido de titânio dopado com érbio (Er:TiO_2) e ferrites de cobalto (CoFe_2O_4) em fungos aquáticos; verificar através de enzimas antioxidantes como a catalase, a glutathione s-transferase e a glutathione peroxidase, o stress oxidativo ao nível celular; testar potenciais efeitos tóxicos em níveis tróficos superiores usando invertebrados detritívoros.

Este documento está dividido em cinco capítulos. O capítulo 1 faz o enquadramento deste trabalho. No capítulo 2, faz-se uma abordagem às técnicas usadas para caracterização das nanopartículas. O capítulo 3 é dedicado aos impactos crónicos das NPs sobre a comunidade fúngica associada à decomposição da folhada nos rios. O capítulo 4 foca-se nos efeitos subletais das NPs sobre invertebrados detritívoros após a exposição através das folhas (alimento) e da água e por último, no capítulo 5 são apresentadas as conclusões gerais e as perspetivas futuras.

Capítulo 2

2. Caraterização das nanopartículas

2.1. Introdução

Embora não exista um protocolo para determinar quais os parâmetros físico-químicos mais relevantes, o tamanho, a área superficial, a composição das NPs, assim como as suas características morfológicas, são de elevada importância em testes toxicológicos (Paschoalino et al. 2010). As principais técnicas usadas para caraterizar NPs são: a difração de raios-x (Limbach et al. 2005), a dispersão dinâmica da luz e o índice de polidispersão (Bootz et al. 2004), a microscopia eletrónica de transmissão, microscopia eletrónica de varrimento, espectroscopia de energia dispersa de raios-x, área superficial específica, microscopia de força atómica (Powers et al. 2006). Contudo, as técnicas de caraterização que foram usadas neste estudo para caraterizar as NPs utilizadas serão descritas a seguir.

A dispersão dinâmica de luz (DLS) é uma técnica usada para medir o tamanho e a distribuição do tamanho de partículas, na região submicrométrica. Este método mede a flutuação da intensidade da luz dispersa provocada pelo movimento das partículas (movimento Browniano das partículas). Este movimento faz com que a luz laser que incide nas partículas seja espalhada com diferentes intensidades (Malvern Instruments 2013; Malvern Instruments 2013a). O princípio deste método consiste em relacionar a velocidade de difusão das partículas, provocada pelos seus movimentos Brownianos com o tamanho das mesmas. A intensidade de dispersão da luz detetada está diretamente relacionada com a velocidade de difusão das partículas e, conseqüentemente, com o tamanho destas, uma vez que quanto maior for a partícula, mais lento será o seu movimento Browniano (menor velocidade de difusão), contrariamente, às partículas mais pequenas que apresentam uma maior velocidade, pelo facto de estas colidirem com as moléculas do solvente.

A intensidade de dispersão de luz a um ângulo específico tende a variar com o tempo, sendo que estas variações são detetadas por um fotodetetor e são analisadas por um autocorrelacionador digital, que gera uma correlação que é proporcional ao coeficiente de difusão de partículas (D). A partir do coeficiente de difusão de partículas, o tamanho das partículas é estimado através da equação de Stokes-Einstein, onde K é a constante de Boltzmann (equação 1), T a temperatura absoluta e η a viscosidade (Hassellöv et al. 2008; Malvern Instruments 2013; Malvern Instruments 2013a).

$$d = \frac{TK}{3\pi\eta D} \quad (\text{equação 1})$$

O diâmetro que é calculado pela técnica de DLS é o valor referente ao modo como a partícula se difunde no meio líquido (Figura 2.1), logo a denominação de diâmetro hidrodinâmico médio ($d(H)$). Ao calcular o diâmetro hidrodinâmico médio considera-se que as partículas são esferas perfeitas (Malvern Instruments 2013; Malvern Instruments 2013a).



Figura 2.1 Diâmetro hidrodinâmico médio de uma nanopartícula através da técnica de DLS (Adaptado de Instruments 2013)

O índice de polidispersão (Pdi) é um parâmetro calculado a partir de uma análise da função de autocorrelação da intensidade de dispersão de luz. Pode variar entre 0 e 1, sendo que para valores entre 0,1 e 0,2 é geralmente aceite como uma solução monodispersa (as partículas têm todas um tamanho aproximadamente igual). Pelo contrário, um índice de polidispersão elevado sugere populações de partículas com uma ampla distribuição de tamanho ou até várias populações (Gaumet et al. 2008).

Nesta análise, um único tamanho de partícula é assumido e um ajuste exponencial simples é aplicado à função de autocorrelação. Os valores de Pdi são utilizados para descrever a amplitude da distribuição de tamanho das partículas (Malvern Instruments 2013; Malvern Instruments 2013a).

A maioria das partículas dispersas em meio aquoso, tende a adquirir uma carga elétrica superficial, principalmente devido a mudanças na interface com o meio

dispersante, mas também pela dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou pela adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão (Brookhaven 2013; Malvern Instruments 2013b).

A carga superficial modifica a distribuição de íões envolventes, resultando assim num aumento da concentração de íões à volta da partícula, conferindo-lhe deste modo uma camada elétrica dupla (Figura 2.2). Esta camada elétrica dupla é constituída por uma parte interna onde se encontram íões fortemente ligados à superfície da partícula e por uma parte externa variável, onde fatores como a temperatura e forças eletrostáticas determinam a disposição dos íões. Na parte externa da camada elétrica dupla, o potencial tende a decrescer com o afastamento da partícula até atingir o valor zero (Brookhaven 2013).

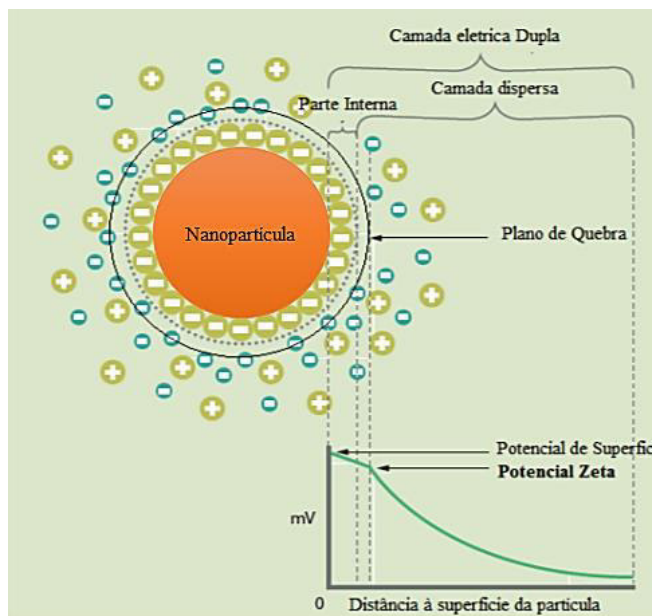


Figura 2.2 Representação esquemática das várias camadas associadas a uma partícula em suspensão (Adaptado de Delgado 2013)

A partícula e a sua parte interna da camada elétrica dupla movem-se como uma só, fazendo com que a parte externa se arraste e provoque o “rompimento” entre os íões das duas partes, interna e externa. A região onde ocorre esta separação de partes denomina-se plano de quebra (Brookhaven 2013). Deste modo, o potencial ζ pode definir-se como a diferença de potencial elétrico entre o plano de quebra e um ponto no fluido da suspensão. Assim, o potencial ζ é determinado pela mobilidade eletroforética das partículas, o qual se afirma como um indicador importante e útil, usado para por exemplo prever e controlar a estabilidade de suspensões coloidais e emulsões. Valores de potencial

ζ elevados, quer negativos quer positivos (em módulo), significam que estamos em presença de uma suspensão estável, uma vez que a repulsão entre partículas evita a ocorrência de agregação e consequente precipitação (Brookhaven 2013; Malvern Instruments 2013b).

A técnica de difração de raios-x (DXR) permite caraterizar estruturalmente uma amostra cristalina, nomeadamente, a fase cristalina; o tamanho dos cristais; os defeitos estruturais, entre outras características da amostra (Fialho 2010).

De um modo geral, a determinação da estrutura cristalina é baseada na análise de um feixe de raios-X difratado, após incidir sobre um material cristalino. Os raios-X são obtidos através da colisão de eletrões de elevada energia, pelo aquecimento de um filamento de tungsténio sobre um alvo metálico. O cobre (Cu) é o alvo metálico mais usual. O feixe de eletrões incidente exibe energia suficiente para provocar ionização dos átomos alvo. A expulsão dos eletrões da camada de valência 1s (K) faz com que os eletrões das camadas vizinhas (2p ou 3p) transitem de modo a ocupar os lugares vazios, dando origem à emissão de energia sob a forma de radiação, K_{α} (transição 2p \rightarrow 1s) e K_{β} (transição 3p \rightarrow 1s), sendo os comprimentos de onda caraterísticos do alvo metálico utilizado. Quando a incidência de um feixe de raios-X é feita sobre uma amostra cristalina, uma parte desse feixe é difratado pelos planos do material e o restante é transmitido. Esta difração é resultante da interferência construtiva entre feixes adjacentes que se encontram em fase (Alves 2014), como evidencia o esquema da Figura 2.3.

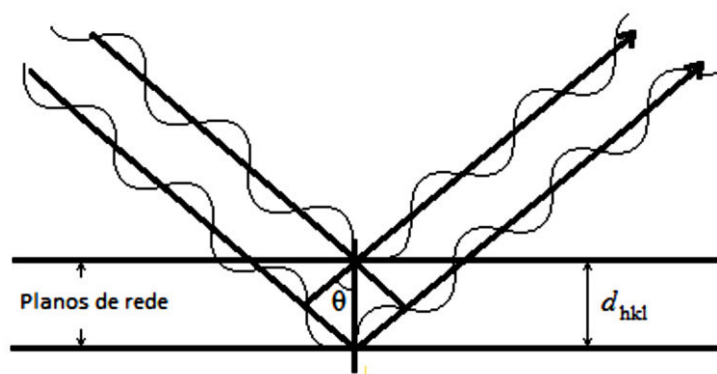


Figura 2.3 Esquema representativo da lei de Bragg (Adaptado de Weller 1994)

A interferência construtiva observa-se quando se dá a equação da lei de Bragg apresentada na equação 2,

$$n\lambda = 2d_{hkl} \sin \theta \quad (\text{equação 2})$$

onde n é a ordem de difração, o λ representa o comprimento de onda da radiação incidente, o d_{hkl} é a distância interplanar e θ o ângulo de incidência ou ângulo de Bragg (Lifshin 2008).

A microscopia eletrónica de transmissão foi usada para observar a morfologia das NPs de ferrites de cobalto, dióxido de titânio e dióxido de titânio dopado com érbio. É uma técnica de caracterização de materiais única, porque combina diferentes técnicas de análise cristalográfica e espectroscópica, assim como de geração de imagens, da mesma região de uma amostra (<100 nm de espessura) (Ramirez 2010).

As lentes eletromagnéticas são utilizadas para focar o feixe de eletrões na amostra. Ao passar através da amostra, os átomos que constituem o feixe de eletrões produzem diferentes tipos de radiação. Apenas os eletrões transmitidos são analisados pelo detetor. É na coluna, onde o feixe de eletrões é gerado e orientado de modo a atravessar a amostra e onde a imagem será ampliada para efetuar a análise e registo digital (ver Figura 2.4) (Kestenbach et al. 1994). Durante a análise, a coluna deve estar sob vácuo, porque só assim o feixe de eletrões será produzido. Caso contrário, os eletrões irão percorrer apenas curtas distâncias e serão barrados por colisão com moléculas de gás. Uma voltagem é aplicada entre o filamento (negativo) e uma das placas, o ânodo (positivo). Ao fluir uma corrente através do filamento, ele é aquecido por incandescência, fazendo com que emita eletrões. Estes são atraídos em direção ao ânodo, que tem carga oposta, e alguns deles passam através da abertura central. Esta carga negativa ocasiona a concentração dos eletrões, emitidos pelo filamento, num feixe que passa simetricamente ao longo do eixo do canhão através da abertura central do ânodo (Grimstone 1980).

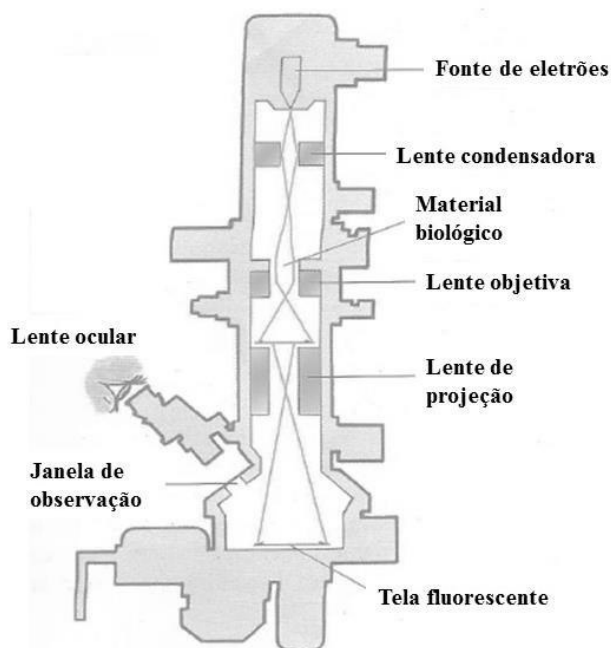


Figura 2.4 Esquema representativo da Microscopia Eletrónica de Transmissão (Adaptado de <http://micro-esalq.blogspot.pt/2012/03/aula-2-microscopia-eletronica.html>)

Quanto maior a espessura da amostra ou o número atómico, menor será o número de eletrões transmitidos, originando uma região mais escura na imagem produzida. O contraste de difração é referente ao espalhamento elástico nas amostras cristalinas. Após os eletrões atravessarem a amostra, os feixes transmitidos e difratados podem ser recombinados no plano da imagem para resolução direta da rede cristalina, constituindo assim o contraste de fase digital (Kestenbach et al. 1994).

2.2. Material e Métodos

Os métodos utilizados para caraterização das nanopartículas usadas foram: a microscopia eletrónica de transmissão, a dispersão dinâmica de luz (DLS), o potencial zeta, e a difração de raios-x (DRX).

A análise por DLS foi realizada com o Zetasizer NANO ZS-ZEN3600 da Malvern (Malvern Instruments Limited, UK), usando um laser He-Ne (comprimento de onda de 633 nm) e um ângulo de deteção de 173° (backscatter detection). As nanopartículas magnéticas (NPMs) foram dispersas em água ultrapura, de modo a evitar concentrações elevadas que resultariam em dispersão múltipla da luz, e filtrada (poro 22 µm). Em seguida foi analisada numa cuvete de poliestireno com um tempo de estabilização de 4 minutos (mínimo) a 25°C. Para cada amostra foram realizadas, pelo menos, 6 medições

(recomendação realizada pelo fabricante). O *software* usado para obtenção dos dados foi o Zetazizer 6.2, da Malvern Instruments Ltd.

O potencial ζ foi determinado com o Zetasizer, NANO ZS -ZEN3600 da Malvern (Malvern Instruments Limited, UK) usando um laser He-Ne, com um comprimento de onda de 633 nm e um ângulo de detecção de 173° (backscatter detection). A dispersão de NPs de ferrites de cobalto foi analisada numa cuvete de poliestireno e para cada amostra foram realizadas 6 medições. O *software* usado para obtenção dos dados foi o Zetazizer 6.2, da Malvern Instruments Ltd.

As partículas secas obtidas foram caraterizadas por difração de raios-X com um difratómetro PW 1710 da Philips e radiação Cu K α (40 kV e 30 mA) com comprimento de onda de 1.5405600 Å, sendo os respetivos espectros obtidos no software PC-APD, Diffraction.

O microscópio eletrónico utilizado foi um LEO 906E, a uma voltagem de 100 KeV. As amostras foram preparadas por deposição de uma gota de solução de partículas numa grelha de cobre deixando secar.

2.3. Resultados

2.3.1. Dispersão dinâmica da luz

Os gráficos da Figura 2.5 mostram o tamanho hidrodinâmico médio das nanopartículas de CoFe₂O₄, Er: TiO₂ e TiO₂, obtido por dispersão dinâmica da luz.

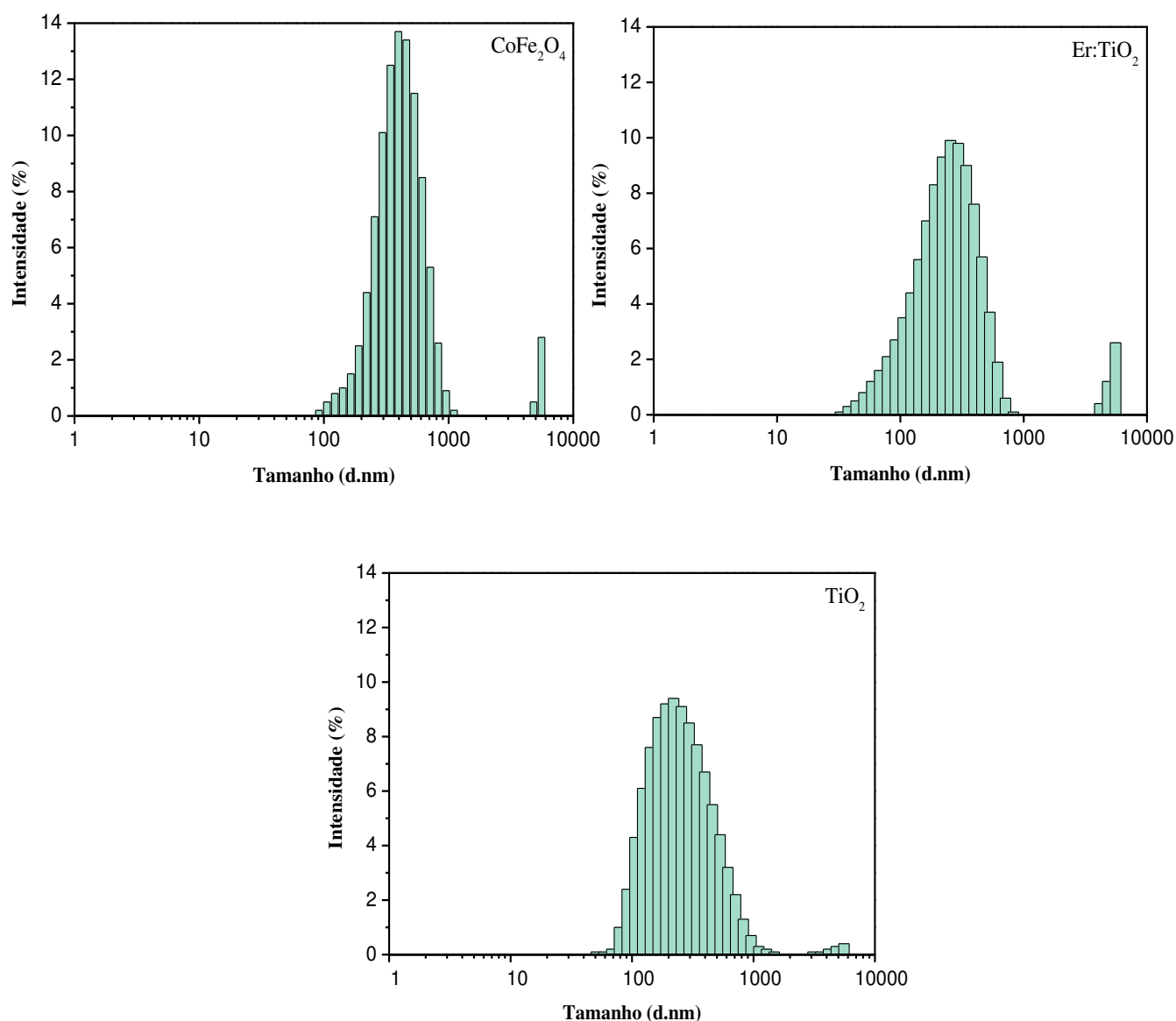


Figura 2.5 Histograma do tamanho hidrodinâmico médio das nanopartículas de CoFe_2O_4 , Er:TiO_2 e TiO_2 . Valores médios obtidos com seis medições consecutivas após quatro minutos de tempo de estabilização à temperatura de 22°C

No que diz respeito ao tamanho hidrodinâmico apresentado pelas três NPs, este difere entre elas apenas nas NPs magnéticas (CoFe_2O_4). Estas têm um Z-médio de 472.6 ± 47.74 nm, enquanto as NPs de TiO_2 têm um tamanho 222.1 ± 3.518 e o Er:TiO_2 241.5 ± 22.74 nm. Já o índice de polidispersão das CoFe_2O_4 e do Er:TiO_2 têm valores aproximados, de 0.467 ± 0.047 e 0.449 ± 0.019 , respetivamente, enquanto o índice de polidispersão do TiO_2 é 0.243 ± 0.011 . As NPs aglomeradas mostram uma taxa de difusão menor quando comparadas com as NPs isoladas e, neste sentido, um diâmetro das NPs

obtido por DLS é maior do que um obtido por outras técnicas (Bradbury et al. 1986). As NPs com diâmetros maiores inflacionam significativamente as distribuições por intensidade (Ober and Gupta 2011; Pecora 2013).

2.3.2. Potencial zeta

A Figura 2.6 apresenta os gráficos respeitantes à carga eletrostática periférica média das nanopartículas de CoFe_2O_4 , TiO_2 e TiO_2 dopado com érbio, obtida pela técnica do potencial ζ .

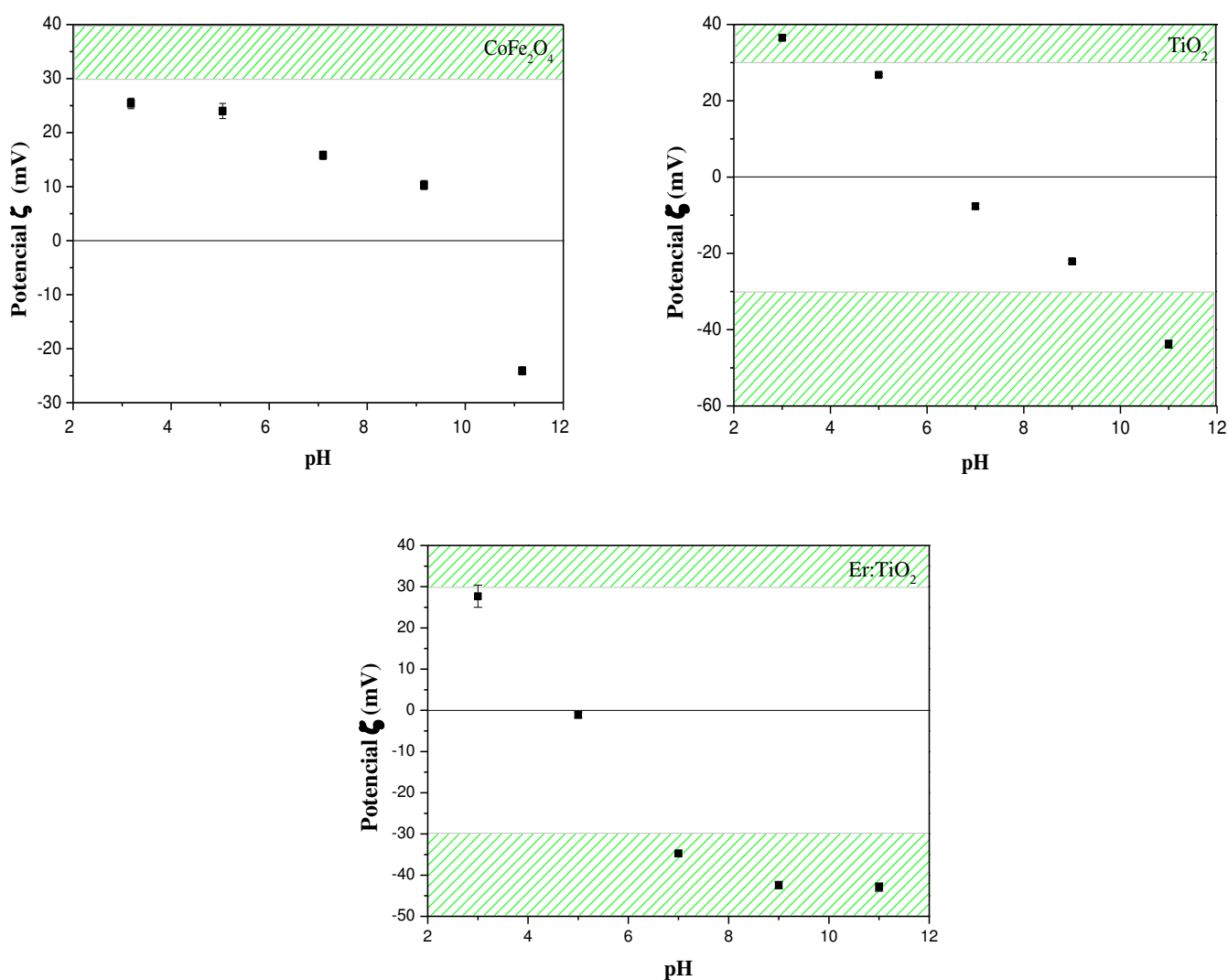


Figura 2.6 Potencial ζ das nanopartículas de CoFe_2O_4 de TiO_2 e de Er: TiO_2 . Valores médios obtidos com seis medições consecutivas após quatro minutos de tempo de estabilização à temperatura de 22°C para os valores de pH 3, 5, 7, 9 e 11

Determinar o valor de potencial zeta é um parâmetro de grande importância uma vez que dá a indicação da estabilidade das partículas. As NPs de CoFe_2O_4 para $\text{pH}=11$ apresentam um potencial $\zeta = -25$ mV, isto é, evidenciam estabilidade a curto prazo a valores de pH mais básicos. O TiO_2 mostra que a estabilidade das NPs é alcançada para valores de $\text{pH}=3$ e 11, com potencial $\zeta = -36,5$ e -45 mV, respetivamente. Já o Er: TiO_2 exhibe estabilidade numa gama de pH mais alargada, pH 7 a 11, tratando-se também de partículas estáveis a partir do valor de pH neutro a básico.

Pela visualização do gráfico da Figura 2.6, existe uma variação de valores de potencial zeta obtidos entre as NPs de CoFe_2O_4 , o TiO_2 e o Er: TiO_2 , uma vez que a $\text{pH}=3$ o potencial zeta é mais elevado para o TiO_2 do que para o Er: TiO_2 e para as CoFe_2O_4 . O mesmo se verifica para os valores de $\text{pH}=11$, onde o TiO_2 (potencial $\zeta = -43,8$ mV) e o Er: TiO_2 (potencial $\zeta = -42,9$ mV) apresentam um potencial zeta mais elevado negativamente do que nas CoFe_2O_4 (potencial $\zeta = -24,1$ mV). Neste sentido, valores de potencial zeta superiores a 30 mV indicam que as NPs apresentam elevados valores de carga periférica, contribuindo para a repulsão das NPs aumentando a estabilidade, impedindo a agregação e a precipitação (Ökte and Yilmaz 2008).

2.3.3. Difração de raios-X

A difração de raios-x (XRD) foi usada para determinar a estrutura e as fases cristalinas das diferentes NPs utilizadas neste estudo. Identificaram-se 7 picos mais pronunciados para o TiO_2 (Figura 2.7) e 6 picos para o Er: TiO_2 (Figura 2.8), sendo que o pico de largura estreita e mais acentuado foi identificado no plano cristalográfico 101 ou a $25,3^\circ$ para as diferentes NPs. Os picos acentuados dos padrões confirmaram a estrutura cristalina das amostras de TiO_2 (Li et al. 2006). Juntamente com os picos das NPs de TiO_2 apresentam-se os picos mais acentuados da anatase ($25,3^\circ$ e 48°) e do rutilo ($27,4^\circ$, $36,1^\circ$ e $41,2^\circ$) (2 das 3 fases do TiO_2).

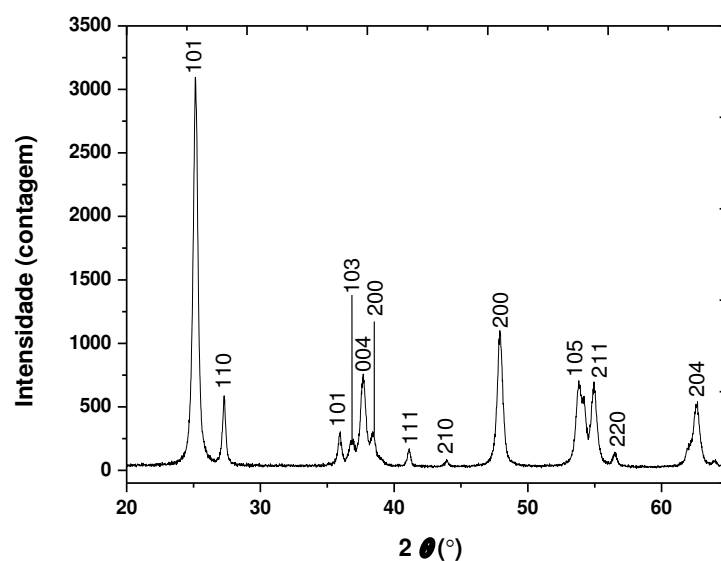


Figura 2.7 Difratoograma de raios-x das amostras das NPs de TiO_2

Os resultados do DRX confirmam a formação de uma estrutura de Er: TiO_2 a $2\theta=25.3^\circ$, 37.8° , 48.0° , 53.9° , 55.1° e 62.7° que são distribuídos nos planos (101), (004), (200), (105), (204) e (116) (Figura 2.8) que correspondem a uma estrutura cristalina do titânio característica da fase anatase (Martins et al. 2014).

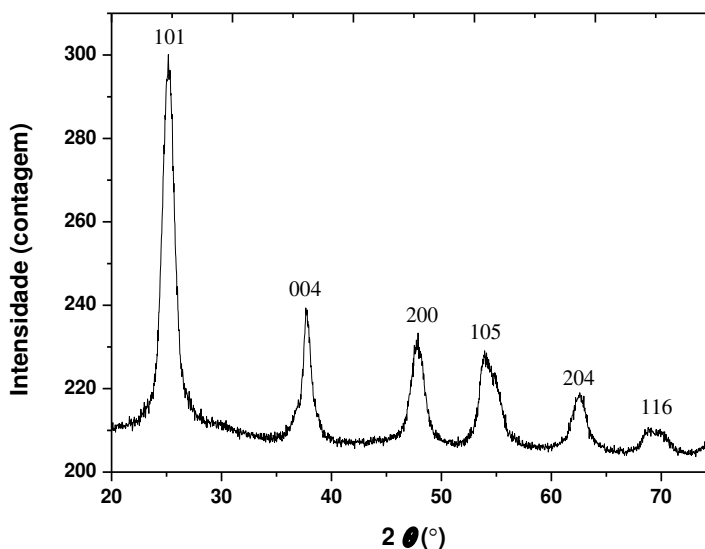


Figura 2.8 Difratoograma de raios-x das amostras das NPs de Er: TiO_2

Na DRX para as NPs de CoFe_2O_4 foram identificados os picos de difração a $2\theta=18.6^\circ$, 30.4° , 35.7° , 43.4° , 53.8° , 57.2° e 62.9° que são distribuídos nos planos (111),

(220), (311), (400), (422), (511) e (440) (ver Figura 2.9) e correspondem a uma estrutura cristalina em espinela cúbica (Habibi and Parhizkar 2015). Os picos acentuados também confirmam a boa cristalização das NPs (Zhang et al. 2016).

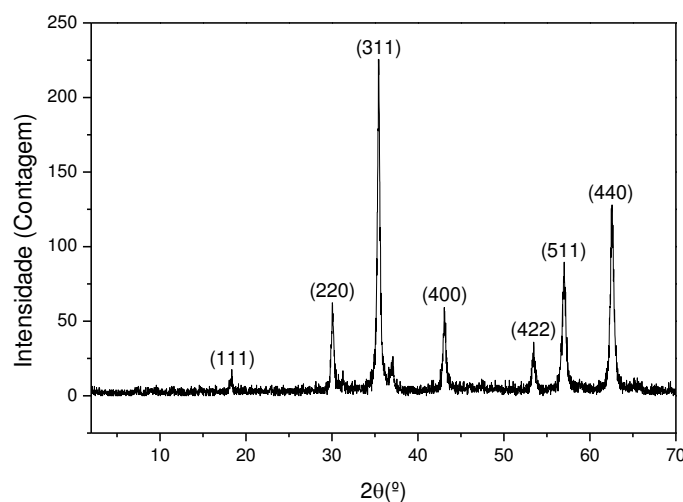


Figura 2.9 Difratoograma de raios-x das amostras das NPs de CoFe₂O₄

2.3.4. Microscopia eletrônica de transmissão

A imagem de microscopia eletrônica de transmissão da Figura 2.10 é referente às NPs de Er: TiO₂ que apresenta uma morfologia irregular, com uma estrutura retangular de faces planas e um diâmetro médio estimado em cerca de 10 nm.

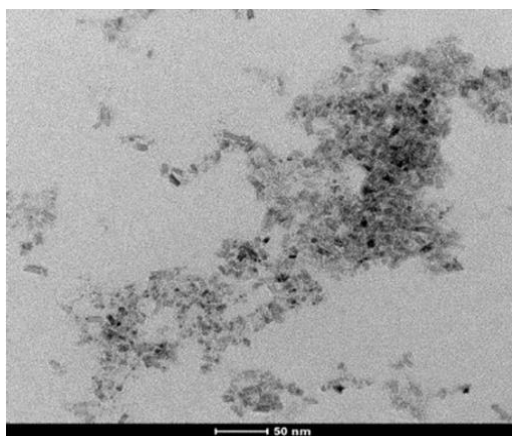


Figura 2.10 Imagem de microscopia eletrônica de transmissão das NPs de Er: TiO₂

Na Figura 2.11 observa-se as NPs de TiO_2 que também exibiram uma morfologia irregular, com um diâmetro médio de cerca de 20 nm.

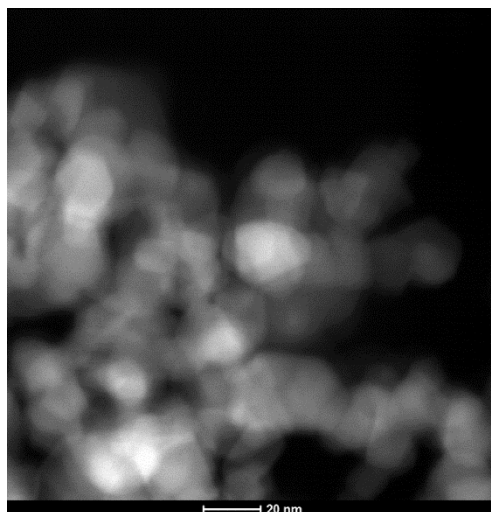


Figura 2.11 Imagem de microscopia eletrônica de transmissão das NPs de TiO_2

As nanopartículas de CoFe_2O_4 apresentaram-se sob a forma de aglomerados com um diâmetro médio estimado de 200 nm. A morfologia das NPs mostra-se circular e irregular tal como se pode visualizar na Figura 2.12.

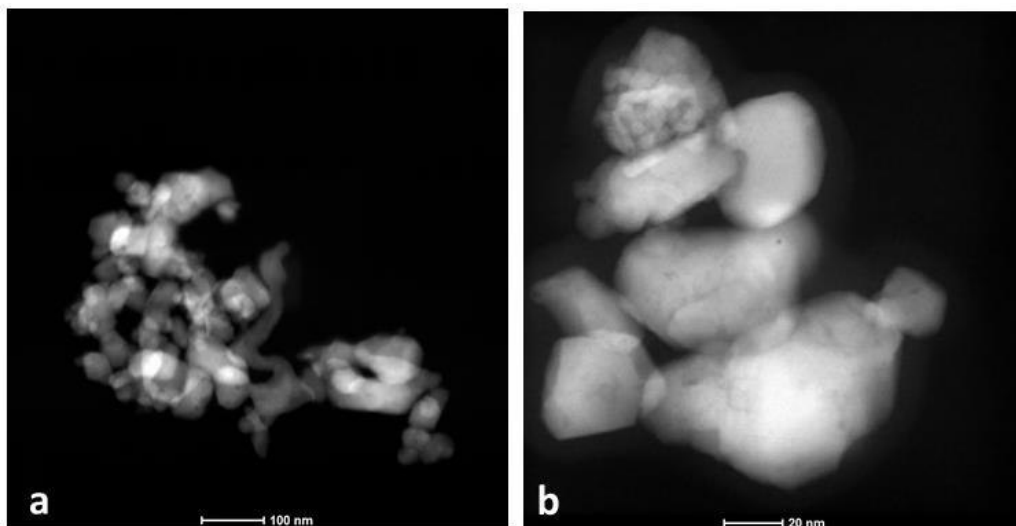


Figura 2.12 Imagens de microscopia eletrônica de transmissão das NPs de CoFe_2O_4

2.4. Discussão

Para este estudo, as NPs de Er: TiO₂ foram produzidas em laboratório, enquanto as de TiO₂ e as CoFe₂O₄ foram adquiridas comercialmente, da Evonik Industries, Alemanha e da Nanostructured & Amorphous Materials, Inc. USA, respetivamente.

Através da TEM obteve-se o tamanho das NPs de TiO₂, com cerca de 20 nm e das CoFe₂O₄ cerca de 200 nm, estando estes resultados de acordo com os valores dos fabricantes. Já o tamanho do Er: TiO₂ obtido por TEM foi de cerca de 10 nm.

A estrutura dos cristais e a pureza das amostras foi estudada através da DRX. As amostras apresentaram picos de difração para o Er: TiO₂, a $2\theta=25.3^\circ$, 37.8° , 48.0° , 53.9° , 55.1° e 62.7° correspondentes aos planos (101), (004), (200), (105), (204) e (116) (Figura 2.8) que correspondem a uma estrutura cristalina do titânio característica da fase anatase (Martins et al. 2014). As estruturas cristalinas das NPMs apresentam picos de difração a $2\theta=18.6^\circ$, 30.4° , 35.7° , 43.4° , 53.8° , 57.2° e 62.9° que se distribuem pelos planos (111), (220), (311), (400), (422), (511) e (440) (ver Figura 2.9) que correspondem a uma estrutura cristalina em espinela cúbica (Habibi and Parhizkar 2015).

O tamanho hidrodinâmico obtido para as CoFe₂O₄ é de 472.6 nm, enquanto as NPs de TiO₂ e Er: TiO₂ apresentam um tamanho hidrodinâmico de 222.1 e 241.5 nm, respetivamente. Os resultados obtidos por DLS mostram também um Pdi para as NPs de CoFe₂O₄ de 0,467 e para as NPs de TiO₂ e Er: TiO₂ de 0.243 e 0.449, respetivamente. Apesar do tamanho hidrodinâmico do Er: TiO₂ (241,5 nm) ser semelhante com o TiO₂ (222,1 nm), o Er: TiO₂ (0,449) tem um Pdi mais elevado quando comparado com o do TiO₂ (0,243) indicando, assim, que as NPs de Er: TiO₂ apresentam heterogeneidade de tamanho. A mesma situação se verificou para as NPMs (0,467) que também apresentam um Pdi elevado. A diferença entre a TEM e o DLS pode ser explicada pela agregação das NPs quando em solução aquosa e pela presença de agregados com diferentes tamanhos que inflacionam o tamanho das NPs. Pode concluir-se que mesmo na ausência de campo magnético externo, as interações magnetostáticas entre partículas, podem originar a sua aglomeração (Aqil et al. 2008). E acrescenta-se, no que toca as NPMs a tendência para a agregação é maior devido às interações eletrostáticas (Amiri and Shokrollahi 2013).

Os valores obtidos pelo potencial zeta, mostram que as NPs Er: TiO₂ são as que parecem ter maior estabilidade para uma gama mais ampla de valores de pH (ver gráfico da Figura 2.6). Para os valores de pH=7, 9 e 11, o potencial $\zeta=-34,7$; $-42,4$ e $-42,9$, respetivamente. Já o TiO₂ revelou ser estável para valores de pH = 3 e 11, sendo que a

pH=3 o potencial $\zeta=36,5$ e a pH=11 o potencial $\zeta=-43,8$. As NPMs aparentam ter estabilidade a curto prazo para os valores de pH=3 e pH=11, onde a pH=3 o potencial $\zeta=25,4$ e a pH=11 o potencial $\zeta=-24,1$. Neste sentido, valores de potencial zeta superiores a $|\zeta| > 30$ mV indicam que as NPs apresentam elevados valores de carga periférica, contribuindo para a repulsão das NPs aumentando a estabilidade, impedindo a agregação e a precipitação (Ökte and Yılmaz 2008).

Pode-se concluir que as NPs de Er: TiO₂ são as mais estáveis para valores de pH básicos, mas com uma heterogeneidade de tamanhos tendo em conta o Pdi e sem tendência em formar agregados para os valores de pH= 5, 7 e 11. As NPMs são as que apresentam maior tamanho hidrodinâmico devido à formação de agregados, são as mais heterogêneas em termos de tamanho de partículas e são as que demonstram ser mais instáveis para toda a gama de pH. Já o TiO₂ tem um tamanho de partícula pequeno (20 nm), o tamanho hidrodinâmico revelou ser também o mais baixo (222,1 nm) face às outras NPs e por sua vez, com o Pdi mais baixo (0,243). Já o potencial zeta revelou ser estável para os valores de pH=3 e 11, o que significa que não há a tendência em formar agregados.

Capítulo 3

3. Impactos das nanopartículas sobre a decomposição do material vegetal nos rios

3.1. Introdução

Nas águas doces, a decomposição do material vegetal que provém da vegetação ribeirinha é realizada por microrganismos, como os fungos aquáticos (Pascoal et al. 2005a; Pascoal et al. 2003), que tornam as folhas mais palatáveis para os invertebrados trituradores promovendo a transferência de carbono e de energia para níveis tróficos superiores (Graca 2001).

Os iões metálicos, como o zinco, o cobre e o cádmio, afetam a decomposição das folhas e as comunidades associadas (Duarte et al. 2008; Fernandes et al. 2009; Medeiros et al. 2010; Moreirinha et al. 2011; Niyogi et al. 2002; Sridhar et al. 2005). Outros estudos sobre organismos aquáticos demonstraram que a toxicidade dos metais iónicos pode ser maior (20-50 vezes) do que a das suas nanoformas (Aruoja et al. 2009; Heinlaan et al. 2008). Segundo Pradhan et al. (2011) os nanometais podem ser uma ameaça às comunidades microbianas que têm como função a degradação do material vegetal nos rios, reduzindo a diversidade e a atividade dos fungos e das bactérias. Apesar dos efeitos negativos das formas iónicas serem mais pronunciados em comparação com as nanoformas, é possível que ocorra acumulação ou adsorção dos nanometais nas células microbianas. Desta forma, os nanometais podem penetrar os detritos aquáticos alimentares e provocar impactos em níveis tróficos superiores (Battin et al. 2009).

Os biomarcadores são utilizados para avaliar stress antropogénicos ambientais (Paoletti 1999). Nas células existem duas formas primordiais de proteção antioxidante: a enzimática e a não enzimática. As enzimas antioxidantes abrangem várias enzimas do ciclo do ascorbato-glutationa, por exemplo a glutatona redutase (GR) e a glutatona peroxidase (GPx) são as mais importante na proteção contra espécies reativas de oxigénio (EROs) (Chen et al. 2010). Assim, as enzimas antioxidantes são consideradas como biomarcadores sensíveis para indicar stress oxidativo em organismos aquáticos induzidos por stressores antropogénicos. A glutatona é uma molécula que estabelece reações de conjugação com vários tipos de compostos. Este tipo de reação é elementar durante o processo de destoxificação do organismo. Ela intercede de uma forma ativa e fundamental para a proteção do organismo contra xenobióticos (Alberts et al. 1994). Uma variação significativa da atividade da GST é por norma observada em organismos e ambientes com

contaminantes. A forma reduzida da glutathione (GSH) tem um papel importante no armazenamento e transporte de cisteína, na defesa celular contra radicais livres, peróxidos e xenobióticos, atuando em conjunto com as enzimas GPx e glutathione S-transferase (GST) (Sies 1999). Muitas vezes a resistência a compostos tóxicos associa-se a uma expressão reforçada da GST (Pastore et al. 2003). A superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT) são as enzimas que interagem primeiro com as espécies reativas de oxigénio no ciclo do ascorbato-glutathione. A primeira faz com que ocorra a dismutação do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogénio (H_2O_2). A segunda converte o peróxido de hidrogénio em água e oxigénio molecular (O_2) (Chen et al. 2010). Através da atividade enzimática da CAT, da GST e da GPx será avaliado o stress oxidativo que as diferentes NPs e o aumento das concentrações têm nos invertebrados trituradores. Desta forma verificar-se-á pelo aumento da atividade das enzimas se as NPs são potencialmente tóxicas em níveis tróficos superiores.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Colonização microbiana no rio

A área de estudo localiza-se na freguesia de Santa Lucrécia de Algeriz, com as coordenadas geográficas N41.587307°, W8.39437°, no concelho de Braga, no nordeste de Portugal. O rio encontra-se numa zona sem habitações, quer a montante quer a jusante (Figura 3.1). A experiência de colonização das folhas pelos fungos aquáticos decorreu durante 12 dias.

A avaliação da qualidade da água do rio é um parâmetro fundamental uma vez que os hifomicetos aquáticos são geralmente encontrados em rios ou ribeiros com águas limpas, bem oxigenadas e moderadamente turbulentas (Ingold 1975). As propriedades físico-químicas da água, a temperatura, o pH, o oxigénio dissolvido e a condutividade elétrica, foram medidos *in situ* utilizando uma sonda de campo multiparamétrico (Multiline F/set 3 no 400,327, WTW). No laboratório, foi determinada a concentração de nitratos (kit HACH, programa 355), de fosfato (kit HACH, programa 480) e de amónia (kit HACH, programa de 385), através de um fotómetro HACH DR/2000 (Hach, Loveland, CO, EUA).

O local onde foram colocados os sacos com as folhas de castanheiro (*Castanea sativa*), exibia uma vegetação circundante do tipo arbórea, onde predominava o

Eucalyptus. O substrato do rio era constituído maioritariamente por areia e calhaus, onde a profundidade não excedia os 30 cm.



Figura 3.1 Fotografia do local onde se colocaram os sacos para colonização das folhas por fungos aquáticos

3.2.2. Exposição em microcosmos

Após 12 dias de colonização das folhas no rio, os sacos foram retirados e levados para o laboratório. No laboratório, abriram-se os sacos, lavaram-se cuidadosamente os discos de folha e o conteúdo de cada um deles foi colocado em erlenmeyers. Cada erlenmeyer representa um microcosmo e no total foram necessários 48 microcosmos (três réplicas para cada concentração) de 150 mL cada. As NPs de TiO_2 , Er: TiO_2 e CoFe_2O_4 foram testadas em 5 concentrações para cada tipo de NP como se segue: [1] = 0,25 mg/L, [2] = 1 mg/L, [3] = 10 mg/L, [4] = 50 mg/L e [5] = 150 mg/L. O meio de cada microcosmo consistiu em 90 mL de água Fastio suplementado com cada tipo de NPs. A água do Fastio[®] (pH $5,8 \pm 0,2$; sílica $9,6 \pm 2$ mg/L; Na^+ $4,1 \pm 0,4$ mg/L; Ca^{2+} $1,3 \pm 0,3$ mg/L; K^+ $0,6 \pm 0,1$ mg/L; HCO_3^- $8,0 \pm 0,8$ mg/L; Cl^- $4,2 \pm 0,4$ mg/L e SO_4^{2-} $1,0 \pm 0,2$ mg/L) foi usada devido às suas propriedades físico-químicas, uma vez que estas são muito semelhantes às características da água do rio Algeriz onde se colocaram as folhas a colonizar.



Figura 3.2 Discos foliares nos microcosmos em agitação a longo de 21 dias com os diferentes tipos de NPs e diferentes concentrações

A troca de meio aquoso efetuou-se de 7 em 7 dias ao longo de 21 dias. Esta experiência foi realizada na ausência de luz, porque o TiO_2 é reativo na presença de radiação, especialmente à radiação ultravioleta (Santos 2008).

3.2.3. Biomassa fúngica

Para quantificar a biomassa de fungos recorreu-se ao método analítico de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Um conjunto de 6 discos de folha foi retirado de cada microcosmo, liofilizado e congelado, para determinar a concentração de ergosterol como medida da biomassa de fungos presente nas folhas. Os lípidos foram extraídos a partir dos discos foliares por aquecimento (80°C , 45 min) em 0,8% de KOH/metanol, purificado por extração de fase sólida e quantificados por HPLC, de acordo com (Gessner 2005). O ergosterol é um tipo de esterol produzido por fungos (Weete and Laseter 1974) que ocorre como componente da membrana celular dos fungos, sendo por isso suscetível de ser correlacionado com a biomassa (Seitz et al. 1977; Seitz et al. 1979). O ergosterol extraído foi convertido em biomassa fúngica assumindo $5,5 \mu\text{g}$ de ergosterol por mg^{-1} de peso seco de micélio (Gessner 2005).

3.2.4. Perda de massa foliar

A massa foliar inicial foi estimada através da imersão de 3 sacos com 60 discos de folhas cada no rio durante 15 minutos, sendo posteriormente, as folhas liofilizadas, de

modo a não alterar, o tamanho, a textura, sais minerais, proteínas, etc, durante 24 horas e pesadas 30 minutos após serem retiradas do liofilizador. Para estimar a perda de massa, no final da experiência, os discos foram retirados dos microcosmos, liofilizados e pesados. A perda de massa foliar foi obtida através da diferença entre o peso inicial e o peso final após a exposição em microcosmos.

3.2.5. Enzimas antioxidantes

Para a extração enzimática da GPx (glutathione peroxidase), da GST (glutathione S-transferase) e da CAT (catalase) foram usados 15 discos foliares de cada microcosmo que foram imediatamente imersos em nitrogênio líquido e mantidos a -80°C.

O primeiro passo foi a homogeneização dos discos foliares com o Ultraturrax T 25 digital (IKA, Staufen, Alemanha) em 0,1 M de fosfato de potássio (K-PO₄) (1:10 w:v) e 1 mM de PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonilo), pH=7,4 a 4°C. Entre cada tratamento e concentração foi realizada uma limpeza com água ultrapura e etanol a 96%. Posteriormente, o homogeneizado foi centrifugado a 10000 ×g durante 20 minutos a 4°C. Em seguida, a parte líquida do centrifugado (extrato sem células) foi retirada e colocada em Eppendorfs e congelada a -80°C para posterior extração enzimática.

A concentração de proteína em extratos livres de células das folhas colonizadas por micróbios, expostas ou não expostas às NPs foi determinada segundo (Bradford 1976) numa microplaca de fundo plano com 96 poços, utilizando albumina de soro bovino como padrão.

As atividades das enzimas antioxidantes foram medidas usando o espectrofotômetro (SpectraMax Plus 384 Microplate Reader, Molecular Devices) com os extratos livres de células nas folhas, expostas ou não expostas às NPs. A atividade da GST foi determinada de acordo com (Habig et al. 1974) com uma ligeira modificação, medindo a formação de 1-glutathione-2,4-dinitrobenzeno, resultado da conjugação da GSH com o substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB). Adicionou-se o extrato isento de células (50 µL) a 250 µL da mistura de reação contendo o tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 6,5), 1,5 mM de CDBN e 1,5 mM de GSH. A atividade da GST foi calculada a partir do declive da curva de absorvância a 340 nm ($\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e normalizada para a concentração de proteína.

A atividade da GPx foi determinada de acordo com (Flohé and Günzler 1984) com uma ligeira alteração (Pradhan et al. 2016a). O extrato livre de células (10 µL) foi

adicionado à mistura de reação (290 μL) contendo 0,05 M da solução tampão de fosfato de potássio (pH= 7,0), 1mM de EDTA, 1 mM de NaN_3 , 1mM de GSH (glutathiona reduzida), 0,24 mM da forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), 0,25 mM H_2O_2 e 0,2 U GR. O H_2O_2 serviu como substrato, enquanto o NaN_3 bloqueava a atividade da CAT. A oxidação da NADPH foi detetada a 340 nm ($\epsilon = 6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) quando a GR reduziu a GSSG (glutathiona oxidada) e a GSH. A atividade da GPx foi calculada a partir do declive da curva de absorvância do NADPH e normalizada para a concentração da proteína.

A atividade da CAT foi determinada de acordo com (Claiborne 1985) com ligeiras modificações. O extrato livre de células (25 μL) foi adicionado a uma mistura de reação (275 μL), contendo 0,05 M da solução tampão de fosfato de potássio, pH = 7,0 e 30 mM de H_2O_2 . A diminuição da absorvância devido à desmutação do H_2O_2 foi detetada aos 240 nm ($\epsilon = 0.04 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A atividade da CAT foi calculada a partir do declive da curva de absorvância de H_2O_2 e normalizada para a concentração da proteína.

3.2.6. Análise estatística

A Two-way ANOVA (análise de variância) foi usada para determinar os efeitos das concentrações das NPs e do tipo de NP na perda de massa foliar, biomassa fúngica e atividade de enzimas antioxidantes colonizadas por comunidades microbianas em folhas (Zar 2009). Diferenças significativas entre o controlo e os tratamentos foram analisados através do Bonferroni post-tests (Zar 2009). As análises foram feitas no Prism 5.0 para o Windows (GraphPad software Inc.).

3.3. Resultados

Na Tabela 3.1 apresentam-se os valores das principais características físico-químicas da água do rio Algeriz com apenas uma medição.

Tabela 3.1 Propriedades físico-químicas da água do rio Algeriz apenas com uma medição avaliadas in situ*

Propriedades físico-químicas	
pH	7,8*
Temperatura	13,5*
Condutividade Elétrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	31*
Oxigénio Dissolvido (mg/L)	9,15*
Taxa de Saturação (%)	95,8*
Fosfato ($\text{PO}_4^{3-} - \text{P}$) (mg/L)	0,017
Nitrato ($\text{NO}_3 - \text{N}$) (mg/L)	0,44
Amónia ($\text{NH}_3 - \text{N}$) (mg/L)	< 0,01

O gráfico da Figura 3.3 representa a decomposição de massa foliar de castanheiro obtida após exposição em microcosmos às NPs ao longo de 21 dias. A exposição foliar às diferentes NPs não mostrou efeitos significativos na taxa de decomposição foliar (ANOVA, $P > 0,05$).

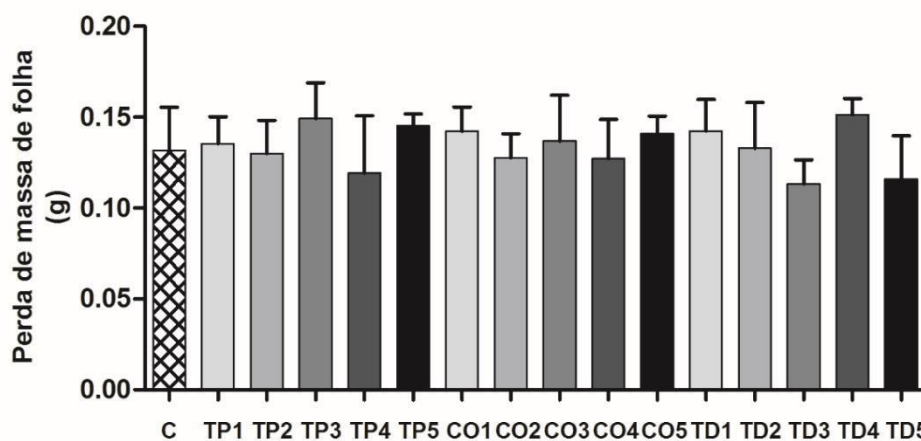


Figura 3.3 Taxa de decomposição foliar para as diferentes NPs de TiO_2 (TP), Er: TiO_2 (TD) e de CoFe_2O_4 (Co). C = controlo, TP1=0,25 mg/L, TP2= 1 mg/L, TP3=10 mg/L, TP4= 50 mg/L e TP5=150mg/L; Co1=0,25 mg/L, Co2=1 mg/L, Co3=10 mg/L, Co4=50 mg/L e Co5=150mg/L; TD1=0,25 mg/L, TD2=1 mg/L, TD3=10 mg/L, TD4=50 mg/L e TD5=150mg/L, M+EPM, n=3.

No gráfico da Figura 3.4, apresenta-se o efeito das NPs sobre a biomassa dos fungos (concentração de ergosterol). As concentrações das NPs e o tempo de exposição

a que os discos foliares estiveram expostos não afetaram a biomassa fúngica (ANOVA, $P > 0,05$). Também não houve diferenças estatísticas entre as diferentes NPs (ANOVA, $P > 0,05$), ou seja, as NPs não diminuíram a biomassa fúngica apesar das diferenças entre as concentrações. Quer nas concentrações mais baixas (0,25, 1 e 10 mg/L), quer nas mais elevadas (50 e 150 mg/L) não é evidente que as concentrações afetaram a biomassa de fungos.

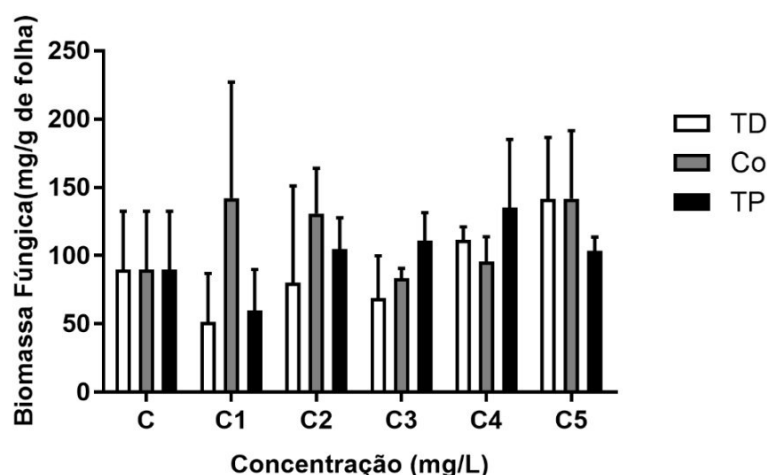


Figura 3.4 Concentração de ergosterol como medida da biomassa fúngica das diferentes NPs de TiO_2 (TP), Er: TiO_2 (TD) e de CoFe_2O_4 (Co). C=controlo, C1=0,25 mg/L, C2=1mg/L, C3=10 mg/L, C4=50 mg/L e C5=150 mg/L, M+EPM, n=3.

O gráfico da Figura 3.5 mostra a atividade enzimática da GST (Glutathione S-Transferase). Os resultados mostraram que existem diferenças entre os tratamentos com as NPs e o controlo (ANOVA, $P = 0,0009$). A atividade da GST aumentou em função do aumento das concentrações. No entanto, a interação não foi significativa ($(F_{10,36}) = 4,041$; $P = 0,8147$). É nas concentrações de 50 e 150 mg/L que a atividade desta enzima mais se pronuncia. O TiO_2 foi a NP que promoveu maior atividade enzimática.

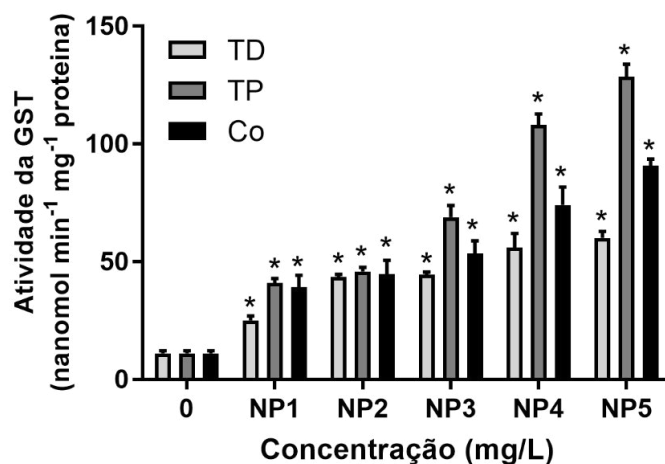


Figura 3.5 Atividade enzimática da Glutathione S-Transferase em folhas expostas às diferentes NPs de TiO₂ (TP), Er: TiO₂ (TD) e de CoFe₂O₄ (Co), onde NP1=0,25 mg/L, NP2=1 mg/L, NP3=10 mg/L, NP4=50 mg/L e NP5=150 mg/L. M+EPM, n=3

A atividade enzimática da glutathione peroxidase apresenta-se no gráfico da Figura 3.6. Pela análise dos resultados há diferenças estatísticas entre as diferentes NPs e as concentrações (ANOVA, $P < 0,0001$). No entanto, a interação da enzima com as concentrações não foi significativa ($(F_{10,36}) = 120,7$; $P = 3,222$). A atividade desta enzima está mais pronunciada nas concentrações de 50 e 150 mg/L para as NPs de TiO₂. Já as NPs de CoFe₂O₄ e Er: TiO₂ apenas promoveram um aumento gradual da atividade enzimática.

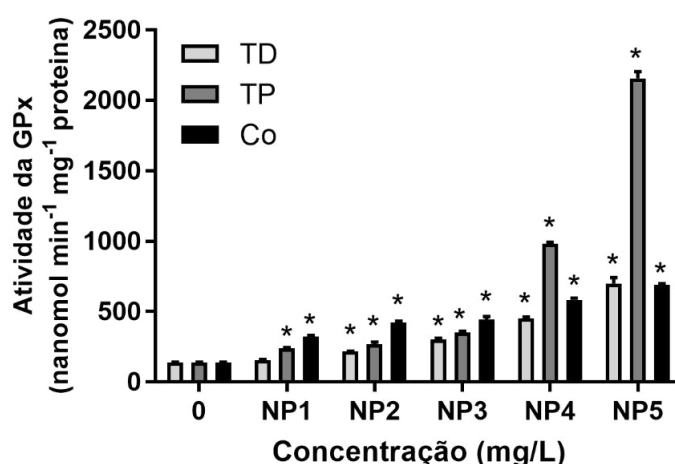


Figura 3.6 Atividade enzimática da glutathione peroxidase em folhas expostas a TiO₂ (TP), Er: TiO₂ (TD) e de CoFe₂O₄ (Co). NP1=0,25 mg/L, NP2=1 mg/L, NP3=10 mg/L, NP4=50 mg/L e NP5=150 mg/L. M+EPM, n=3

A atividade da catalase aumentou à medida que aumentaram as concentrações (ANOVA, $P < 0,0001$) das NPs (Figura 3.7). O TiO_2 apresentou uma atividade enzimática mais evidente na concentração de 150 mg/L. No entanto, todas as NPs exibem um aumento gradual com o aumento da concentração. Contudo, a interação das concentrações com o tipo de NP não foi significativa ($(F_{10,36}) = 11,08$; $P = 0,8432$).

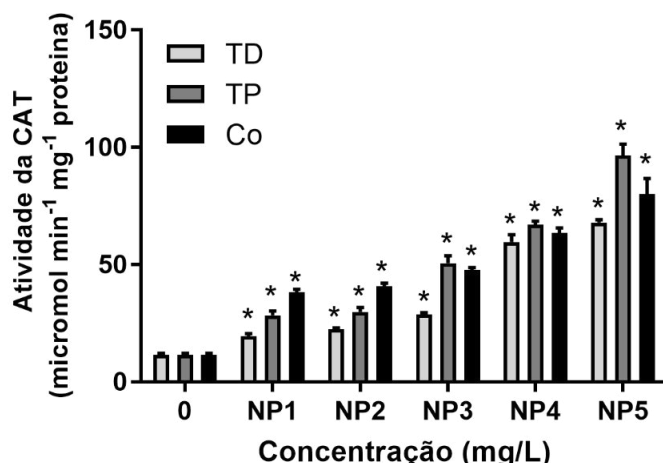


Figura 3.7 Atividade enzimática da catalase para as diferentes NPs de TiO_2 (TP), Er: TiO_2 (TD) e de CoFe_2O_4 (Co). NP1=0,25 mg/L, NP2=1 mg/L, NP3=10 mg/L, NP4=50 mg/L e NP5=150 mg/L

3.4. Discussão

O principal objetivo deste estudo foi testar o efeito de NPs de TiO_2 , Er: TiO_2 e CoFe_2O_4 sobre fungos aquáticos decompositores da folhada e possíveis efeitos nos invertebrados detritívoros que a consomem.

Após 21 dias em microcosmos na ausência de luz, a perda de massa foliar dos discos de folhas de castanheiro e da biomassa fúngica não foram afetados significativamente pelas NPs na gama de concentrações testadas. No entanto, as NPs afetaram significativamente as atividades das enzimas antioxidantes em comunidades microbianas associadas à decomposição foliar.

A gama de concentrações utilizadas neste estudo vai de encontro com a de alguns estudos. Xiong et al. 2011 testou concentrações de 0, 10, 50, 100, 150, 200 e 300 mg/L para o TiO_2 onde avaliou a toxicidade, o stress oxidativo e o dano oxidativo em peixes-zebra. Pradhan et al. 2012 estudou o efeito de NPs de CuO num invertebrado triturador (*Allogamus ligonifer*) com concentrações de 0, 50, 100, 250, 500 e 1000 mg L⁻¹ através

de uma exposição subletal aguda avaliando o comportamento alimentar, a taxa de crescimento e a mortalidade. Wang et al. 2016 testaram a taxa de inibição de crescimento da alga *P. tricornutum* com NPs de TiO₂ numa gama de concentrações de 5, 10, 20, 50, 100 e 200 mg/L. Ahmad et al. 2015 através de uma exposição subletal aguda estudou o efeito das NPs de CoFe₂O₄ na mortalidade e malformações nos embriões de peixe-zebra com uma gama de concentrações de 0, 10, 62.5, 125, 250, 500 µM.

Os organismos dispõem de mecanismos chamados sistemas antioxidantes capazes de prevenir os danos que as EROs podem causar (Gate et al. 1999). Neste trabalho, a atividade enzimática da GST, GPx e da CAT foi mais evidente nas NPs de TiO₂ para as concentrações mais elevadas (10, 50 e 150 mg/L). Apesar das NPs TiO₂ mostrarem maior efeito na atividade das enzimas, todas as enzimas foram estimuladas de forma dependente da dose pelas NPs. Ao contrário do que se esperava, o TiO₂ revelou ser mais tóxico para os invertebrados do que o Er: TiO₂. Num estudo de toxicidade crónica com ratos onde se utilizou o Er: TiO₂ revelou que ele é tóxico e causou danos em vários órgãos após a sua alimentação. Em todos os órgãos estudados, estas NPs exibiram nos animais um efeito depressivo e produziram a morte por paralisia respiratória associada ao colapso cardiovascular (Haley et al. 1966). Uma atividade enzimática aumentada é uma resposta microbiana que denuncia o stress oxidativo destes organismos na presença das NPs, tal efeito deve-se à suscetibilidade de cada organismo na presença delas. O aumento mais acentuado da atividade enzimática na presença de TiO₂, pode ser causado pelo menor tamanho hidrodinâmico destas NPs (Figura 2.5), uma vez que a diminuição do tamanho tende a aumentar o seu nível de toxicidade (Heinlaan et al. 2008; Hoecke et al. 2009). A libertação de NPs de CoFe₂O₄ pode levar à sua biodegradação resultando na libertação de iões Co²⁺ e Fe³⁺ no meio ambiente. Estes iões podem induzir stress oxidativo através da libertação de EROs (Novak et al. 2013) mesmo em organismos de diferentes níveis tróficos (Barhoumi and Dewez 2013). Diversos artigos estudaram o comportamento de invertebrados de água doce, especialmente crustáceos, na presença do TiO₂. As características físico-químicas destas NPs podem explicar a variabilidade nos dados de toxicidade obtidos por diferentes autores com experiências semelhantes, mas com as mesmas espécies (Menard et al. 2011).

Ao contrário do que se esperava, o TiO₂ revelou-se mais tóxico para os microrganismos do que Er: TiO₂ e as CoFe₂O₄. Apesar do Er: TiO₂ (10nm) possuir um tamanho inferior ao TiO₂ (20 nm), o TiO₂ mostrou ser mais tóxico em oposição a dados encontrados na literatura onde muitos autores referem que quanto mais pequenas as NPs

maior o seu potencial tóxico. A instabilidade destas NPs e consequente tendência em formar agregados, pode ser a causa da toxicidade para os microrganismos. O valor de pH da água usada para a exposição crónica é de $\approx 5,8$ o que coloca estas NPs com valores de potencial zeta próximos de 10 mV, tornando-as mais instáveis em comparação às outras NPs. Assim, os resultados obtidos sugerem, então, que existe ecotoxicidade das NPs de TiO_2 para os fungos aquáticos.

Capítulo 4

4. Efeitos subletais agudos das nanopartículas em trituradores de água doce

4.1. Introdução

A toxicidade de um composto químico depende de diversos fatores, como do tempo de exposição, da suscetibilidade do organismo, das características químicas do agente e dos fatores ambientais (Rand and Petrocelli 1985).

Os efeitos toxicológicos aquáticos podem ser qualitativos e quantitativos, assumindo um efeito letal e subletal nos organismos, através de, alterações no crescimento, na reprodução, no desenvolvimento, no comportamento, na fisionomia e na farmacocinética (Rand and Petrocelli 1985). Assim sendo, os efeitos podem ser expressos através de critérios mensuráveis, como o número de organismos mortos, alterações de tamanho e peso, percentagem de inibição de enzimas, entre outros (Rand and Petrocelli 1985).

Para a realização dos testes toxicológicos é necessário o contacto entre um organismo e um composto químico, sendo que os fatores mais importantes relacionados com a exposição são: o tipo, a duração, a frequência da exposição e a concentração do agente tóxico (Rand 1995).

A duração e a frequência de exposição de organismos a um agente tóxico também afetarão a sua toxicidade. A exposição pode ser diferenciada em aguda e crónica. Na primeira, os organismos entram em contacto com o tóxico num momento único ou em vários momentos que ocorrem num pequeno período de tempo, variando entre horas e dias. Desta forma, os efeitos tornam-se imediatos, tendo em conta que o tóxico é rapidamente absorvido, apesar de poderem existir efeitos retardados similares aos resultantes de uma exposição crónica (Gherardi-Goldstein et al. 1990). Na exposição crónica, os organismos, por norma, são expostos a baixas concentrações do agente tóxico que é libertado continuamente ou com alguma periodicidade ao longo de um determinado período de tempo. Esta exposição pode também incitar a efeitos rápidos e imediatos para além dos que se desenvolvem lentamente ao longo do tempo (Rand and Petrocelli 1985).

Os invertebrados de água doce, são modelos amplamente aceites para testes ecotoxicológicos devido à sua distribuição global, elevada abundância, taxas de reprodução elevadas, ciclos de vida curtos, rápida adaptação a condições laboratoriais e elevada sensibilidade a contaminantes, incluindo nanopartículas à base de metais

(Pradhan et al. 2012). Os invertebrados trituradores desempenham um papel chave na cadeia alimentar dos detritos vegetais em rios de floresta de baixa ordem, transferindo carbono e energia do material para níveis tróficos superiores (Graça and Canhoto 2006). Estes trituradores são muito sensíveis à qualidade da água. Portanto, neste estudo, o objetivo foi investigar as respostas destes invertebrados trituradores às várias NPs de base metálica numa exposição subletal através da água e do alimento.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Colheita de invertebrados e exposição às nanopartículas

A larva da família *Sericostomatidae* da ordem *Trichoptera* pertence a invertebrados trituradores muito frequentes no Norte de Portugal e Sudoeste Europeu. Esta família habita em ambientes aquáticos com boa qualidade da água (Bonada et al. 2008; Pradhan et al. 2012).

Os animais com cerca de 1-1,2 cm de comprimento (Figura 4.1c) foram recolhidos no rio Cávado na região de Montalegre (Figura 4.1a). Para testar o potencial efeito tóxico das NPs de TiO_2 , Er: TiO_2 e de CoFe_2O_4 , os animais foram expostos 5 dias em microcosmos (Figura 4.1d) a folhas de castanheiro previamente expostas e não expostas a NPs.

Foi avaliado o comportamento alimentar dos invertebrados na presença de água contaminada e na presença de folhas pré-contaminadas. Nos microcosmos onde as folhas não tinham NPs foram adicionadas na água duas concentrações (1 e 50 mg/L). Ao mesmo tempo, foram também imersos sacos de malha fina (0.5 mm) (Figura 4.1b) com cinco discos de folhas para exposição microbiana durante 5 dias para avaliar o comportamento alimentar da comunidade microbiana presente na folhada. Com o recurso à Two-way ANOVA, determinou-se o comportamento alimentar (discos pré-contaminados e água contaminada) dos invertebrados e dos micróbios.

4.2.2. Taxa de consumo de folhas por invertebrados e micróbios

A massa de folha seca dos discos foliares consumidos pelos invertebrados (L_e) foi determinada através de $(L_i - L_f) - (L_i \times (C_i - C_f) / C_i)$, onde L_i e L_f representam a massa (mg) inicial (L_i) e final (L_f) dos discos foliares expostos aos invertebrados, e C_i e C_f

representam a massa seca inicial (mg) dos discos foliares do controlo (Pradhan et al. 2012). A taxa de consumo de discos foliares pelos invertebrados foi calculada ao fim de 5 dias, sendo os resultados expressos em mg da massa seca de discos foliares por mg^{-1} de massa seca dos animais dia^{-1} (Ferreira et al. 2010).

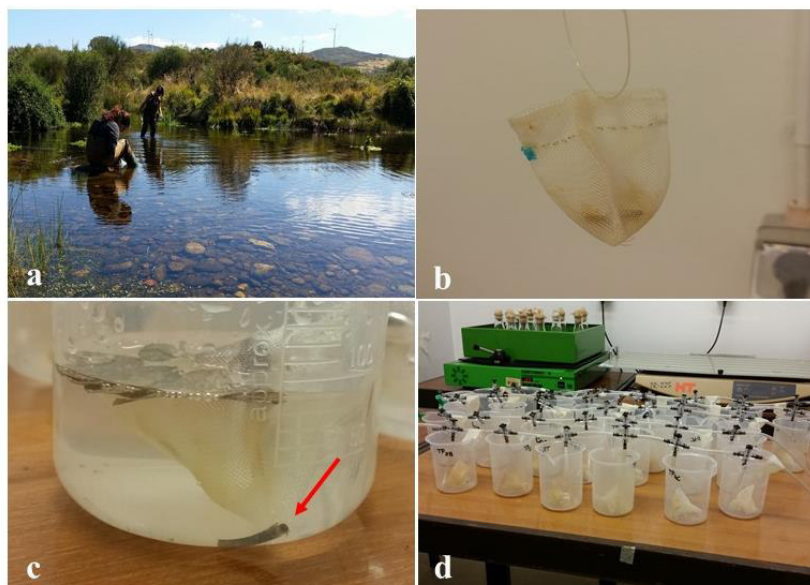


Figura 4.1 (a) Local de recolha dos invertebrados; (b) sacos de malha fina para exposição microbiana; (c) microcosmo com a larva da família *Sericostomatidae*; (d) exposição em microcosmos para alimentação dos invertebrados

A taxa de decomposição microbiana foi determinada como $(C_i - C_f) / t$, onde t representa o tempo (5 dias). A taxa de consumo total foi determinada por $((C_i - C_f) + L_e) / t$ e expressa em mg de massa de folha seca mg^{-1} microcosmo $^{-1}$ dia^{-1} .

4.2.3. Análise estatística

Two-way ANOVAs foram usadas para calcular os efeitos subletais das concentrações, a decomposição da folhada pelos micróbios e a taxa de consumo das folhas pelos invertebrados (Zar 2009). Foram testadas as diferenças significativas entre o controlo e os tratamentos através de Bonferroni post-tests (Zar 2009). As análises foram feitas no Prism 5.0 para o Windows (GraphPad software Inc.).

4.3. Resultados

A taxa de consumo de discos foliares pelos invertebrados expostos a 1 e 50 mg/L das NPs de TiO₂, Er: TiO₂ e CoFe₂O₄ adicionadas na água é apresentada no gráfico da Figura 4.2. A taxa de consumo de folhas pelos invertebrados durante 5 dias de exposição foi de 0,149 mg de massa seca de animais dia⁻¹ no controlo. Pela análise estatística, a taxa de consumo de folha foi estatisticamente significativa entre as concentrações (Two-way ANOVA, $P < 0,0001$). No entanto, a interação das diferentes NPs e das concentrações não foi significativa ($(F_{4,18}) = 0,03553$; $P = 0,9974$). As diferenças entre as diferentes concentrações testadas são traduzidas pelas letras *a* e *b*, onde *a* é a semelhança entre as concentrações e *b* a diferença das mesmas. No gráfico da Figura 4.2, as concentrações de 1 e de 50 mg/L apresentam semelhanças (*b*) entre si, ou seja, o consumo de folhas foi baixo em ambas as concentrações relativamente ao controlo (*a*).

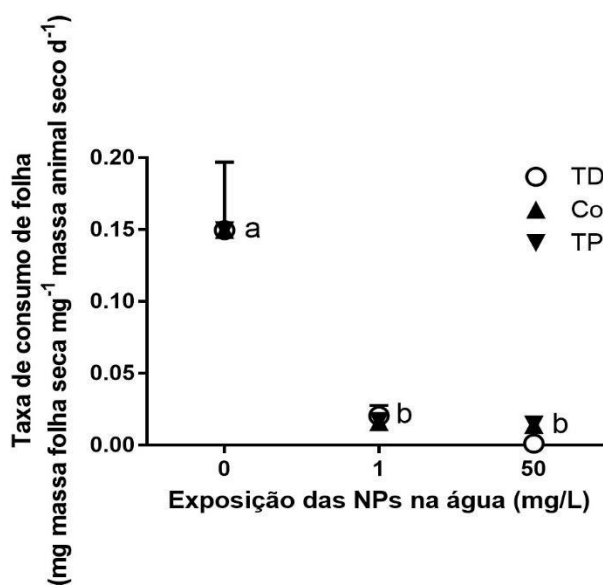


Figura 4.2 Taxa de consumo de folhas de castanheiro por invertebrados após 5 dias de exposição às NPs de TiO₂, Er: TiO₂ e de CoFe₂O₄ na água. M±EPM, n=3

O gráfico da Figura 4.3 é referente à taxa de consumo de discos de folhas durante a exposição às concentrações de 1 e 50 mg/L de NPs de TiO₂, Er: TiO₂ e de CoFe₂O₄. A taxa de consumo de discos foliares foi significativamente diferente entre as diferentes concentrações (Two-way ANOVA, $P=0,0005$). Contudo, a interação das diferentes NPs e das diferentes concentrações não foi significativa ($(F_{4,18}) = 0,2567$; $P = 0,9018$).

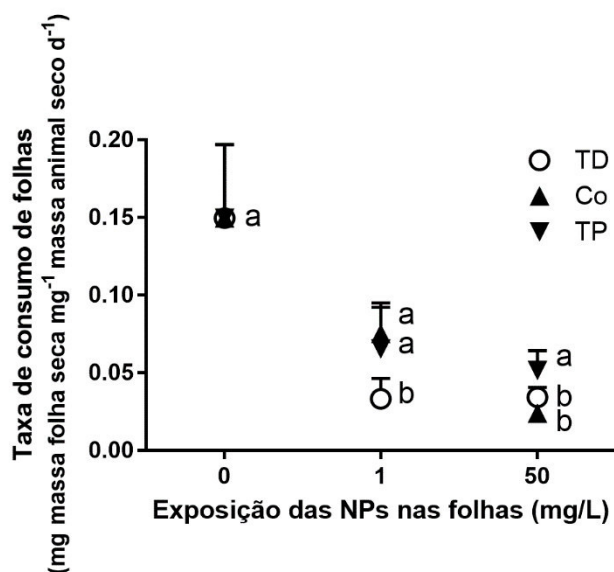


Figura 4.3 Taxa de consumo das folhas de castanheiro por invertebrados após 5 dias de exposição a NPs de TiO₂, Er: TiO₂ e de CoFe₂O₄ nas folhas. M+EPM, n=3

A taxa de decomposição microbiana é apresentada no gráfico da Figura 4.4 para as concentrações de 1 e de 50 mg/L. As NPs foram adicionadas na água e os discos foliares estavam isentos de qualquer tratamento. A taxa de decomposição microbiana para o controlo foi de 0,406 mg de massa seca de folha/dia. Através da análise estatística, comprovou-se que não existiram diferenças significativas entre os tratamentos e as diferentes concentrações (Two-way ANOVA, $P > 0,05$). A interação das concentrações e das NPs não foi significativa ($(F_{4,18}) = 0,2152$; $P = 0,9265$).

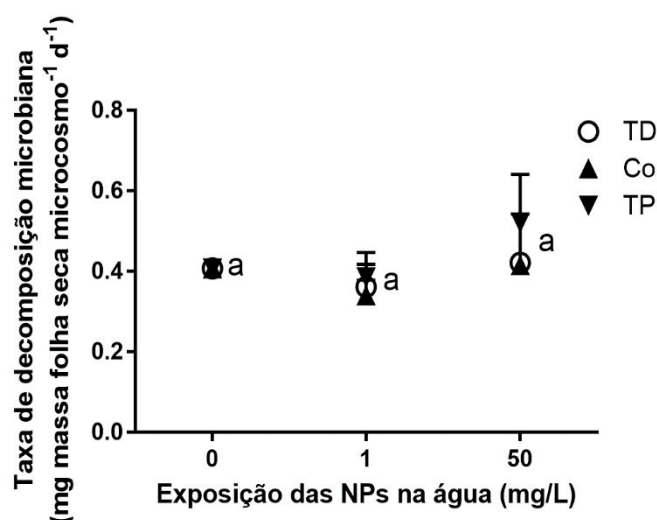


Figura 4.4 Taxa de decomposição microbiana das folhas de castanheiro por invertebrados após 5 dias de exposição a NPs de TiO₂, Er: TiO₂ e de CoFe₂O₄ na água. M+EPM, n=3

Para a taxa de decomposição microbiana com os discos foliares previamente contaminados com NPs, também não houve diferenças significativas entre os tratamentos e as diferentes concentrações, como se observa no gráfico da Figura 4.5 (Two-way ANOVA, $P > 0,05$). A interação entre as concentrações e as distintas NPs também não foram significativas ($(F_{4,18}) = 0,2152$; $P = 0,9265$).

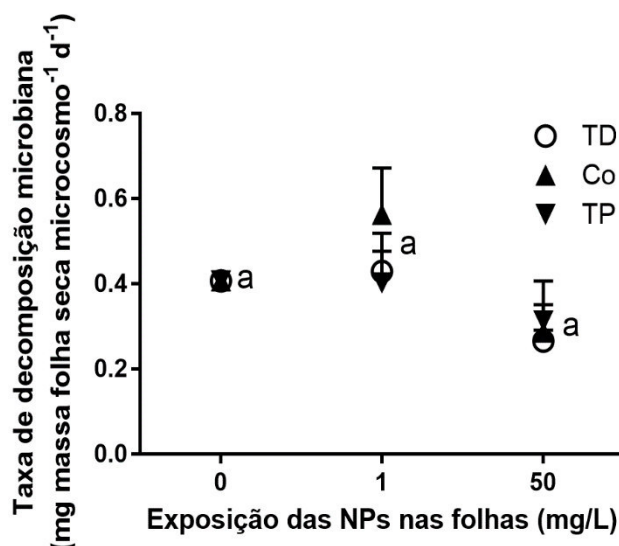


Figura 4.5 Taxa de decomposição microbiana das folhas de castanheiro por invertebrados após 5 dias de exposição a NPs de TiO_2 , Er: TiO_2 e de CoFe_2O_4 nas folhas, M+EPM, $n=3$

A taxa de consumo total dos discos de folhas na presença ou ausência das NPs suspensas em água foi diferente (Two-way ANOVA, $P < 0,0001$) (Figura 4.6). A taxa de consumo total pelos invertebrados e micróbios no controlo foi de $3,11 \text{ mg}^{-1}$ de massa de folha seca microcosmo⁻¹ dia⁻¹. A taxa de consumo total não foi significativamente afetada pelo tipo de NPs (Two-way ANOVA, $P > 0,05$). Contudo, as NPs de dióxido de titânio dopado com érbio, para a concentração mais elevada tiveram uma diminuição na taxa de consumo total. Os resultados da interação não se mostraram significativos ($(F_{4,18}) = 0,1735$; $P = 0,9491$).

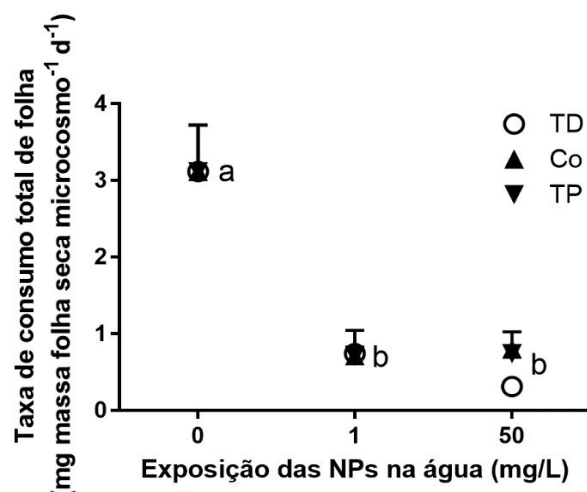


Figura 4.6 Taxa de consumo total das folhas de castanheiro por invertebrados após 5 dias de exposição a NPs de TiO_2 , Er: TiO_2 e de CoFe_2O_4 na água, M+EPM, n=3

A taxa de consumo total dos discos foliares, pelos invertebrados, nos discos pré-contaminados foi diferente para as NPs na concentração de 50 mg/L (Two-way ANOVA, $P < 0,001$). No controlo e na concentração de 1 mg/L não houve diferenças estatisticamente significativas (Two-way ANOVA, $P > 0,05$; Figura 4.7). Na concentração de 50 mg/L observaram-se diferenças entre as NPs de Er: TiO_2 e as CoFe_2O_4 com as NPs de TiO_2 . A interação não se mostrou significativa entre as concentrações e diferentes NPs ($(F_{4,18}) = 0,7934$; $P = 0,5447$).

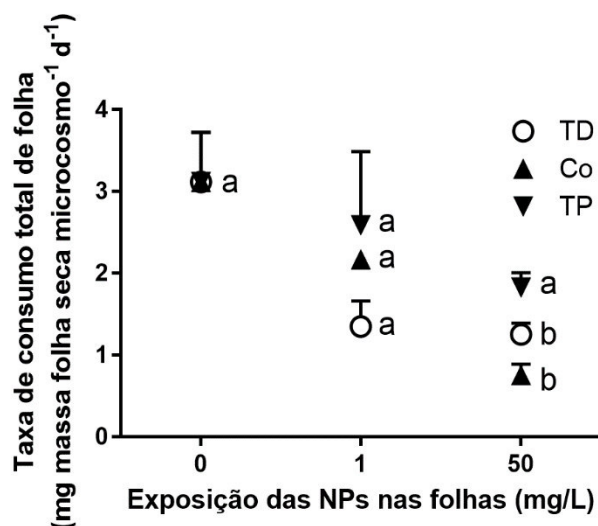


Figura 4.7 Taxa de consumo total das folhas de castanheiro por invertebrados após 5 dias de exposição a NPs de TiO_2 , Er: TiO_2 e de CoFe_2O_4 nas folhas. M+EPM, n=3

4.4. Discussão

O comportamento alimentar dos invertebrados é uma das ferramentas de monitorização mais aceite e sensível em ecotoxicologia para testar os efeitos subletais dos metais (Pestana et al. 2007) e nanometais (Buffet et al. 2011; Galloway et al. 2010).

A decomposição microbiana não se mostrou significativamente afetada quer pela água contaminada, quer pelos discos pré-contaminados. A taxa de consumo total mostrou que o Er: TiO₂ (0,31093 mg/L) teve efeitos mais pronunciados quando fornecido através da água. As NPs de CoFe₂O₄ (0,754177 mg/L), nos discos contaminados, mostraram um efeito mais acentuado na concentração de 50 mg/L, seguindo-se o Er: TiO₂ (0,802075 mg/L).

De um modo geral, pode-se dizer que as NPs tiveram efeitos sobre os invertebrados. Quando as NPs são expostas na água o efeito no comportamento alimentar torna-se mais pronunciado do que com o alimento contaminado. O Er: TiO₂ (0,31093 mg/L) e as CoFe₂O₄ (0,79939 mg/L) tiveram mais impacto na taxa de consumo total na concentração de 50 mg/L. A instabilidade destas NPs, ou seja, a tendência em formar agregados, pode estar associada ao valor de pH 5,8 da água usada na exposição crónica, uma vez que, quanto mais próximo de zero for o potencial zeta menos estáveis serão as NPs.

Num estudo onde se testaram 13 tipos de lantanídeos, incluindo o érbio, em algas marinhas revelou que os lantanídeos tinham o mesmo nível de toxicidade nas células das algas. Tai et al. (2010) mostrou ainda que os diferentes lantanídeos têm o mesmo nível de toxicidade em organismos vivos de nível trófico superior como, por exemplo, ratos. No nosso estudo, os efeitos tóxicos observados nos invertebrados trituradores, ligeiramente superiores no Er: TiO₂, podem ser resultantes da toxicidade induzida pela presença do érbio que contraria os resultados obtidos anteriormente. Noutro estudo de toxicidade aguda testaram-se concentrações de 0, 10, 62.5, 125, 250, 500 µM das NPs de CoFe₂O₄ em embriões de peixe-zebra (*Danio rerio*). Os resultados revelaram que estas NPs induzem toxicidade aguda, nomeadamente ao nível do desenvolvimento, na apoptose, atraso na eclosão, batimento cardíaco instável, flexão da cauda e da medula espinhal e mudanças comportamentais nos embriões. Estas NPs também induziram o stress físico, que resultou no movimento reduzido dos embriões com atraso na eclosão e stress oxidativo, que afetaram as membranas através da apoptose na região da cabeça,

coração e cauda. Estes resultados evidenciaram um potencial risco das NPs de CoFe_2O_4 para o ambiente (Ahmad et al. 2015a).

Ao contrário do que se verificou no capítulo anterior, onde o TiO_2 mostrou ser mais tóxico para a comunidade fúngica, neste capítulo obteve-se resultados contrários. As NPs de CoFe_2O_4 e de Er: TiO_2 revelaram ser mais tóxicas para os invertebrados. Estes resultados podem estar associados à suscetibilidade dos diferentes organismos para as mesmas NPs. A comunidade microbiana pode ser mais tolerante às CoFe_2O_4 e ao Er: TiO_2 enquanto os invertebrados podem ser menos tolerantes a estas NPs.

Capítulo 5

5. Conclusão geral e perspectivas futuras

As propriedades particulares das NPs têm acelerado o crescimento e a produção de materiais em nanoescala e, por conseguinte, o rápido aumento das suas aplicações nas mais diversas áreas (Poole et al.), como a eletrónica, a biomedicina, os produtos farmacêuticos, os cosméticos, a análise e remediação ambiental, a catálise e as ciências dos materiais (Schmid 2011).

O destino e o impacto das NPs no ambiente está a tornar-se cada vez mais importante devido às descargas que já ocorreram no ambiente, o provável aumento à medida que a indústria de nanotecnologias cresce, a toxicidade conhecida das NPs e as lacunas no nosso conhecimento, levam à dificuldade da avaliação e da gestão de riscos (Handy et al. 2008a; Handy et al. 2008b). Outro fator importante a considerar, são as várias formas como as NPs se podem apresentar após o contacto com o ambiente, com os organismos vivos ou com os materiais presentes, uma vez que podem estar presentes na forma livre ou em aglomerados (Farré et al. 2009).

Nas águas doces, a decomposição do material vegetal que provém da vegetação ribeirinha é realizada por microrganismos, como os fungos aquáticos (Pascoal et al. 2005a; Pascoal et al. 2003), e por invertebrados trituradores que promovem a transferência de carbono e de energia para níveis tróficos superiores (Graca 2001). Alguns estudos demonstraram que a decomposição do material vegetal é sensível às mudanças das propriedades físicas e químicas da água (Fernandes et al. 2009; Pascoal and Cássio 2004; Pascoal et al. 2003; Pradhan et al. 2015; Pradhan et al. 2016a). Além disso, o processo de decomposição da folhada foi proposto como uma medida funcional de modo a avaliar a qualidade dos sistemas de água doce (Pascoal et al. 2001; Pascoal et al. 2003).

Para avaliar o potencial efeito tóxico das NPs de TiO_2 , Er: TiO_2 e das CoFe_2O_4 , foram testadas cinco concentrações (0,25, 1, 10, 50 e 150 mg/L) das NPs numa exposição em microcosmos contendo discos foliares de castanheiro colonizados por micróbios.

Na exposição crónica não foi evidente o impacto das NPs na decomposição da folhada nem na biomassa fúngica. Contudo, ao nível celular foram avaliadas a atividade da CAT, GST e GPx como uma medida de potencial stress oxidativo na comunidade microbiana envolvida na decomposição da folhada. As NPs com base em metais têm a capacidade de produzir EROs e tal facto já foi reportado para alguns organismos, incluindo invertebrados aquáticos (Nel et al. 2009; Pradhan et al. 2016b; Soenen et al. 2011). O TiO_2 apresenta uma atividade da GST consideravelmente superior nas três

concentrações mais elevadas. A GPx apresenta um aumento mais pronunciado apenas nas concentrações de 50 e 150 mg/L e a GST aumenta gradualmente em função do aumento da concentração das NPs.

Após exposição às NPs foi possível observar que o efeito delas sobre a taxa de alimentação dos invertebrados trituradores é mais pronunciado quando as NPs são fornecidas via água contaminada do que via folhada contaminada. A concentração de 50 mg/L do TiO_2 foi a que mostrou diferenças mais acentuadas na taxa de consumo total (promovido pelos invertebrados e os micróbios) das folhas. De um modo geral, a exposição às NPs não afetou a decomposição da folhada da exposição crônica nem a biomassa fúngica. Ainda assim, a exposição aguda revelou que as NPs provocam um efeito significativo nos organismos de ecossistemas de água doce. As NPs promoveram stress oxidativo nos fungos, observado pelo aumento da atividade das enzimas antioxidante, nomeadamente da CAT, GPx e GST, sugerindo que existe ecotoxicidade ao nível celular. O TiO_2 relevou ser mais tóxico ao nível celular do que o Er: TiO_2 e as CoFe_2O_4 , contrariamente ao que se verificou na taxa de consumo total onde o Er: TiO_2 (na água contaminada) e as ferrites de cobalto (folhada contaminada) apresentavam um efeito mais acentuado na diminuição da decomposição foliar. Provavelmente, o menor tamanho hidrodinâmico e a instabilidade do TiO_2 resultaram em maior toxicidade para as comunidades microbianas. No entanto, o Er: TiO_2 e as CoFe_2O_4 revelaram ter mais impacto nos invertebrados do que o TiO_2 .

A nanotecnologia foi identificada como uma das *Key enabling technologies* no Horizonte 2020, e para um desenvolvimento sustentado e responsável, deverá recorrer-se aos dados até agora descobertos no sentido de produzir nanomateriais mais seguros, eliminando as características responsáveis pela sua toxicidade e possibilitando o progresso tecnológico que a aplicação dos novos nanomateriais prenuncia (Savolainen et al. 2013).

A validação de métodos de avaliação de toxicidade numa fase precoce do desenvolvimento dos nanomateriais será fundamental, de forma a evitar grandes perdas económicas resultantes de uma descoberta tardia de toxicidade e poder direccionar a síntese de NPs no sentido de obter moléculas mais seguras para os humanos e para o ambiente.

No que diz respeito a futuras investigações, será interessante abordar outras NPs com diferentes concentrações e um maior tempo de exposição. Atualmente, o aumento médio da temperatura global e a pertinente discussão sobre as alterações climáticas releva especial importância na realização de uma experiência semelhante, no entanto, com uma

Conclusão geral e perspectivas futuras

exposição das NPs a temperaturas superiores. Neste sentido, sabendo que os fungos aquáticos desenvolvem-se à temperatura de cerca de 15°C, avaliar o seu comportamento e reação a uma temperatura mais elevada, será importante para garantir a continuidade destas espécies no futuro.

6. Referências bibliográficas

- Ahmad, F., X. Liu, Y. Zhou & H. Yao, 2015a. An in vivo evaluation of acute toxicity of cobalt ferrite (CoFe₂O₄) nanoparticles in larval-embryo Zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 166:21-28. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.07.003>.
- Ahmad, F., H. Yao, Y. Zhou & X. Liu, 2015b. Toxicity of cobalt ferrite (CoFe₂O₄) nanobeads in *Chlorella vulgaris*: interaction, adaptation and oxidative stress. *Chemosphere* 139:479-485.
- Aitken, R., M. Chaudhry, A. Boxall & M. Hull, 2006. Manufacture and use of nanomaterials: current status in the UK and global trends. *Occupational medicine* 56(5):300-306.
- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts & J. Watson, 1994. *Molecular biology of the cell*. 1994, New York and London. Garland Publishing, Inc.
- Alexopoulos, C. J., C. W. Mims & M. Blackwell, 1996. *Introductory mycology*. John Wiley and Sons.
- Alves, A. G. F., 2014. Nanopartículas de óxidos magnéticos do tipo magnetite para aplicação em hipertermia.
- Amiri, S. & H. Shokrollahi, 2013. The role of cobalt ferrite magnetic nanoparticles in medical science. *Materials Science and Engineering: C* 33(1):1-8. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2012.09.003>.
- Aqil, A., S. Vasseur, E. Duguet, C. Passirani, J.-P. Benoît, A. Roch, R. Müller, R. Jérôme & C. Jérôme, 2008. PEO coated magnetic nanoparticles for biomedical application. *European Polymer Journal* 44(10):3191-3199.
- Aruoja, V., H.-C. Dubourguier, K. Kasemets & A. Kahru, 2009. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Science of the total environment* 407(4):1461-1468.
- Asharani, P., Y. L. Wu, Z. Gong & S. Valiyaveetil, 2008. Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. *Nanotechnology* 19(25):255102.
- Au, D., I. Hodgkiss & L. L. Vrijmoed, 1992. Fungi and cellulolytic activity associated with decomposition of *Bauhinia purpurea* leaf litter in a polluted and unpolluted Hong Kong waterway. *Canadian Journal of Botany* 70(5):1071-1079.
- Baldi, G., D. Bonacchi, C. Innocenti, G. Lorenzi & C. Sangregorio, 2007. Cobalt ferrite nanoparticles: The control of the particle size and surface state and their effects on magnetic properties. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 311(1):10-16.
- Baldy, V., E. Chauvet, J.-Y. Charcosset & M. O. Gessner, 2002. Microbial dynamics associated with leaves decomposing in the mainstem and floodplain pond of a large river. *Aquatic Microbial Ecology* 28(1):25-36.
- Barlocher, F., 1992a. Research on aquatic hyphomycetes: historical background and overview. *The ecology of aquatic hyphomycetes* Springer, Berlin:1-15.
- Barlocher, F., 1992b. Recent developments in stream ecology and their relevance to aquatic mycology *The ecology of aquatic hyphomycetes*. Springer, 16-37.
- Barlocher, F., 2009. Reproduction and dispersal in aquatic hyphomycetes. *Mycoscience* 50(1):3-8.
- Battin, T. J., F. v. Kammer, A. Weilhartner, S. Ottofuelling & T. Hofmann, 2009. Nanostructured TiO₂: transport behavior and effects on aquatic microbial

- communities under environmental conditions. *Environmental science & technology* 43(21):8098-8104.
- Benn, T. M. & P. Westerhoff, 2008. Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics. *Environmental science & technology* 42(11):4133-4139.
- Bilberg, K., H. Malte, T. Wang & E. Baatrup, 2010. Silver nanoparticles and silver nitrate cause respiratory stress in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*). *Aquatic Toxicology* 96(2):159-165.
- Biswas, P. & C.-Y. Wu, 2005. Nanoparticles and the Environment. *Journal of the Air & Waste Management Association* 55(6):708-746 doi:10.1080/10473289.2005.10464656.
- Bonada, N., C. Zamora-Muñoz, M. El Alami, C. Múrria & N. Prat, 2008. New records of Trichoptera in reference mediterranean-climate rivers of the Iberian Peninsula and north of Africa: taxonomical, faunistical and ecological aspects. *Graellsia* 64(2):189-208.
- Bootz, A., V. Vogel, D. Schubert & J. Kreuter, 2004. Comparison of scanning electron microscopy, dynamic light scattering and analytical ultracentrifugation for the sizing of poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 57(2):369-375.
- Boxall, A. B., Q. Chaudhry, C. Sinclair, A. Jones, R. Aitken, B. Jefferson & C. Watts, 2007. Current and future predicted environmental exposure to engineered nanoparticles. Central Science Laboratory, Department of the Environment and Rural Affairs, London, UK 89.
- Bradbury, A., S. Menear & R. Chantrell, 1986. A Monte Carlo calculation of the magnetic properties of a ferrofluid containing interacting polydispersed particles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 54:745-746.
- Bradford, A., R. D. Handy, J. W. Readman, A. Atfield & M. Mühling, 2009. Impact of silver nanoparticle contamination on the genetic diversity of natural bacterial assemblages in estuarine sediments. *Environmental science & technology* 43(12):4530-4536.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72(1-2):248-254.
- Brar, S. K., M. Verma, R. Tyagi & R. Surampalli, 2010. Engineered nanoparticles in wastewater and wastewater sludge—Evidence and impacts. *Waste management* 30(3):504-520.
- Brookhaven, I., 2013. Zeta Potential. In. http://www.brookhaveninstruments.com/products/zeta_potential/p_ZP_overview.htm
- Buffet, P.-E., O. F. Tankoua, J.-F. Pan, D. Berhanu, C. Herrenknecht, L. Poirier, C. Amiard-Triquet, J.-C. Amiard, J.-B. Bérard & C. Risso, 2011. Behavioural and biochemical responses of two marine invertebrates *Scrobicularia plana* and *Hediste diversicolor* to copper oxide nanoparticles. *Chemosphere* 84(1):166-174.
- Carnes, C. L. & K. J. Klabunde, 2003. The catalytic methanol synthesis over nanoparticle metal oxide catalysts. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 194(1):227-236.
- Chen, H., L. Zhou, C.-Y. Lin, M. C. Beattie, J. Liu & B. R. Zirkin, 2010. Effect of glutathione redox state on Leydig cell susceptibility to acute oxidative stress. *Molecular and cellular endocrinology* 323(2):147-154.
- Christensen, M., 1989. A view of fungal ecology. *Mycologia* 81(1):1-19.

- Claiborne, A., 1985. Catalase activity. CRC handbook of methods for oxygen radical research 1:283-284.
- Cserháti, T., E. Forgacs & G. Oros, 2002. Biological activity and environmental impact of anionic surfactants. *Environment international* 28(5):337-348.
- Delgado, J. M. F., 2013. Preparação e caracterização de nanotransportadores (nanocápsulas, nanoesferas, lipossomas e transportadores lipídicos nanoestruturados) sem substância ativa.
- Dentel, S., H. Allen, C. Srinivasarao & J. Divincenzo, 1993. Effects of surfactants on sludge dewatering and pollutant fate. Department of Civil Engineering, University of Delaware (USA).
- Duarte, S., C. Pascoal, A. Alves, A. Correia & F. Cassio, 2008. Copper and zinc mixtures induce shifts in microbial communities and reduce leaf litter decomposition in streams. *Freshwater Biology* 53(1):91-101.
- Eichhorn, P., S. V. Rodrigues, W. Baumann & T. P. Knepper, 2002. Incomplete degradation of linear alkylbenzene sulfonate surfactants in Brazilian surface waters and pursuit of their polar metabolites in drinking waters. *Science of the Total Environment* 284(1):123-134.
- Farré, M., K. Gajda-Schranz, L. Kantiani & D. Barceló, 2009. Ecotoxicity and analysis of nanomaterials in the aquatic environment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 393(1):81-95.
- Federici, G., B. J. Shaw & R. D. Handy, 2007. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquatic Toxicology* 84(4):415-430.
- Fernandes, I., S. Duarte, F. Cássio & C. Pascoal, 2009. Mixtures of zinc and phosphate affect leaf litter decomposition by aquatic fungi in streams. *Science of the Total Environment* 407(14):4283-4288.
- Ferreira, V., A. L. Goncalves, D. L. Godbold & C. Canhoto, 2010. Effect of increased atmospheric CO₂ on the performance of an aquatic detritivore through changes in water temperature and litter quality. *Global Change Biology* 16(12):3284-3296.
- Fialho, M. I. G., 2010. Estudo da dopagem óptica de Al_xGa_{1-x}N por.
- Flohé, L. & W. A. Günzler, 1984. [12] Assays of glutathione peroxidase. *Methods in enzymology* 105:114-120.
- Fujishima, A., T. N. Rao & D. A. Tryk, 2000. TiO₂ photocatalysts and diamond electrodes. *Electrochimica Acta* 45(28):4683-4690.
- Galloway, T., C. Lewis, I. Dolciotti, B. D. Johnston, J. Moger & F. Regoli, 2010. Sublethal toxicity of nano-titanium dioxide and carbon nanotubes in a sediment dwelling marine polychaete. *Environmental Pollution* 158(5):1748-1755.
- Gate, L., J. Paul, G. N. Ba, K. Tew & H. Tapiero, 1999. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 53(4):169-180.
- Gaumet, M., A. Vargas, R. Gurny & F. Delie, 2008. Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceuticals* 69(1):1-9.
- Gessner, M., V. Gulis, K. Kuehn, E. Chauvet & K. Suberkropp, 2007. 17 Fungal Decomposers of Plant Litter in Aquatic Ecosystems. *Environmental and microbial relationships* 4:301.
- Gessner, M. O., 2005. Ergosterol as a measure of fungal biomass Methods to study litter decomposition. Springer, 189-195.

- Gessner, M. O., M. A. Bauchrowitz & M. Escautier, 1991. Extraction and quantification of ergosterol as a measure of fungal biomass in leaf litter. *Microbial Ecology* 22(1):285-291.
- Gessner, M. O., E. Chauvet & M. Dobson, 1999. A perspective on leaf litter breakdown in streams. *Oikos*:377-384.
- Gherardi-Goldstein, E., E. Bertoletti, P. A. Zagatto, R. P. d. A. Araújo, M. d. L. L. d. Ramos & C. d. T. de Saneamento Ambiental, 1990. Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos CETESB série manuais. CETESB.
- Goh, T. & K. Hyde, 1996. Biodiversity of freshwater fungi. *Journal of Industrial Microbiology* 17(5-6):328-345.
- Graca, M. A., 2001. The role of invertebrates on leaf litter decomposition in streams-a review. *International Review of Hydrobiology* 86(4):383-393.
- Graça, M. A. & C. Canhoto, 2006. Leaf litter processing in low order streams. *Limnetica* 25(1-2):001-10.
- Grandi, R., 1999. Taxonomia de deuteromicetos. Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: aplicações biotecnológicas Instituto de Botânica, Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo:141-165.
- Grimstone, A. V., 1980. O microscópio eletrônico em biologia. EPU.
- Habibi, M. H. & J. Parhizkar, 2015. Cobalt ferrite nano-composite coated on glass by Doctor Blade method for photo-catalytic degradation of an azo textile dye Reactive Red 4: XRD, FESEM and DRS investigations. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 150:879-885 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2015.06.040>.
- Habig, W. H., M. J. Pabst & W. B. Jakoby, 1974. Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of biological Chemistry* 249(22):7130-7139.
- Haley, T. J., L. Koste, N. Komesu, M. Efros & H. Upham, 1966. Pharmacology and toxicology of dysprosium, holmium, and erbium chlorides. *Toxicology and applied pharmacology* 8(1):37-43.
- Handy, R. D., T. B. Henry, T. M. Scown, B. D. Johnston & C. R. Tyler, 2008a. Manufactured nanoparticles: their uptake and effects on fish—a mechanistic analysis. *Ecotoxicology* 17(5):396-409.
- Handy, R. D., N. van den Brink, M. Chappell, M. Mühling, R. Behra, M. Dušinská, P. Simpson, J. Ahtiainen, A. N. Jha & J. Seiter, 2012. Practical considerations for conducting ecotoxicity test methods with manufactured nanomaterials: what have we learnt so far? *Ecotoxicology* 21(4):933-972.
- Handy, R. D., F. Von der Kammer, J. R. Lead, M. Hassellöv, R. Owen & M. Crane, 2008b. The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles. *Ecotoxicology* 17(4):287-314.
- Hassellöv, M., J. W. Readman, J. F. Ranville & K. Tiede, 2008. Nanoparticle analysis and characterization methodologies in environmental risk assessment of engineered nanoparticles. *Ecotoxicology* 17(5):344-361.
- Heinlaan, M., A. Ivask, I. Blinova, H.-C. Dubourguier & A. Kahru, 2008. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere* 71(7):1308-1316.
- Heinlaan, M., A. Kahru, K. Kasemets, B. Arbeille, G. Prensier & H.-C. Dubourguier, 2011. Changes in the *Daphnia magna* midgut upon ingestion of copper oxide

- nanoparticles: a transmission electron microscopy study. *Water research* 45(1):179-190.
- Hoecke, K. V., J. T. Quik, J. Mankiewicz-Boczek, K. A. D. Schamphelaere, A. Elsaesser, P. V. d. Meeren, C. Barnes, G. McKerr, C. V. Howard & D. V. D. Meent, 2009. Fate and effects of CeO₂ nanoparticles in aquatic ecotoxicity tests. *Environmental science & technology* 43(12):4537-4546.
- Hoffmann, M. R., S. T. Martin, W. Choi & D. W. Bahnemann, 1995. Environmental applications of semiconductor photocatalysis. *Chemical reviews* 95(1):69-96.
- Hyung, H., J. D. Fortner, J. B. Hughes & J.-H. Kim, 2007. Natural organic matter stabilizes carbon nanotubes in the aqueous phase. *Environmental Science & Technology* 41(1):179-184.
- Ingold, C. T., 1975. Guide to aquatic hyphomycetes. JSTOR.
- Instruments, M., 2013. Dynamic Light Scattering. In. http://www.malvern.com/labeng/technology/dynamic_light_scattering/dynamic_light_scattering.htm.
- Instruments, M., 2013b. Zeta Potential. In. http://www.malvern.com/labeng/technology/zeta_potential/zeta_potential_LDE.htm.
- Instruments., M., 2013a. Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes. In. [http://www.malvern.com/malvern/kbase.nsf/allbyno/KB000792/\\$file/MRK656-01_An_Introduction_to_DLS.pdf](http://www.malvern.com/malvern/kbase.nsf/allbyno/KB000792/$file/MRK656-01_An_Introduction_to_DLS.pdf).
- Jin, Z., W. Duan, B. Liu, X. Chen, F. Yang & J. Guo, 2015. Fabrication of efficient visible light activated Cu-P25-graphene ternary composite for photocatalytic degradation of methyl blue. *Applied Surface Science* 356:707-718.
- Johnson, K. H., K. A. Vogt, H. J. Clark, O. J. Schmitz & D. J. Vogt, 1996. Biodiversity and the productivity and stability of ecosystems. *Trends in Ecology & Evolution* 11(9):372-377.
- Kaegi, R., A. Voegelin, B. Sinnet, S. Zuleeg, H. Hagendorfer, M. Burkhardt & H. Siegrist, 2011. Behavior of metallic silver nanoparticles in a pilot wastewater treatment plant. *Environmental science & technology* 45(9):3902-3908.
- Kägi, R., A. Ulrich, B. Sinnet, R. Vonbank, A. Wichser, S. Zuleeg, H. Simmler, S. Brunner, H. Vonmont & M. Burkhardt, 2008. Synthetic TiO₂ nanoparticle emission from exterior facades into the aquatic environment. *Environmental pollution* 156(2):233-239.
- Karlsson, H. L., P. Cronholm, J. Gustafsson & L. Moller, 2008. Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chemical research in toxicology* 21(9):1726-1732.
- Kestenbach, H.-J., W. Botta & W. Botta, 1994. Microscopia eletrônica: transmissão e varredura. Curso da Associação Brasileira de Metalurgia e Materiais, São Carlos.
- Kirk, P., P. Cannon, D. Minter & J. Stalpers, 2008. Dictionary of the Fungi.(10thedn). Wallingford, UK.
- Kiser, M. A., H. Ryu, H. Jang, K. Hristovski & P. Westerhoff, 2010. Biosorption of nanoparticles to heterotrophic wastewater biomass. *Water Research* 44(14):4105-4114.
- Kjøller, A. & S. Struwe, 1992. Functional groups of microfungi in decomposition Fungal Community Its Organization and Role in Ecosystem. M. Dekker, Inc.
- Kvitek, L., M. Vanickova, A. Panacek, J. Soukupova, M. Dittrich, E. Valentova, R. Prucek, M. Bancirova, D. Milde & R. Zboril, 2009. Initial study on the toxicity of silver nanoparticles (NPs) against *Paramecium caudatum*. *The Journal of Physical Chemistry C* 113(11):4296-4300.

- Laitung, B., J. L. Pretty, E. Chauvet & M. Dobson, 2002. Response of aquatic hyphomycete communities to enhanced stream retention in areas impacted by commercial forestry. *Freshwater Biology* 47(2):313-323.
- Larsen, J., T. W. Schultz, L. Rasmussen, R. Hooftman & W. Pauli, 1997. Progress in an ecotoxicological standard protocol with protozoa: Results from a pilot ringtest with *Tetrahymena pyriformis*. *Chemosphere* 35(5):1023-1041.
- Levard, C., E. M. Hotze, G. V. Lowry & G. E. Brown Jr, 2012. Environmental transformations of silver nanoparticles: impact on stability and toxicity. *Environmental science & technology* 46(13):6900-6914.
- Li, J.-G., X.-H. Wang, H. Kamiyama, T. Ishigaki & T. Sekiguchi, 2006. RF plasma processing of Er-doped TiO₂ luminescent nanoparticles. *Thin Solid Films* 506:292-296.
- Liang, Z., A. Das & Z. Hu, 2010. Bacterial response to a shock load of nanosilver in an activated sludge treatment system. *Water Research* 44(18):5432-5438.
- Lifshin, E., 2008. X-ray Characterization of Materials. John Wiley & Sons.
- Limbach, L. K., Y. Li, R. N. Grass, T. J. Brunner, M. A. Hintermann, M. Muller, D. Gunther & W. J. Stark, 2005. Oxide nanoparticle uptake in human lung fibroblasts: effects of particle size, agglomeration, and diffusion at low concentrations. *Environmental science & technology* 39(23):9370-9376.
- Lok, C.-N., C.-M. Ho, R. Chen, Q.-Y. He, W.-Y. Yu, H. Sun, P. K.-H. Tam, J.-F. Chiu & C.-M. Che, 2007. Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* 12(4):527-534.
- Louro, H., T. Borges & M. J. Silva, 2013. Nanomateriais manufaturados: novos desafios para a saúde pública. *Revista Portuguesa de Saúde Pública* 31(2):188-200.
- Luechinger, N. A., E. K. Athanassiou & W. J. Stark, 2008. Graphene-stabilized copper nanoparticles as an air-stable substitute for silver and gold in low-cost ink-jet printable electronics. *Nanotechnology* 19(44):445201.
- Marquis, B. J., S. A. Love, K. L. Braun & C. L. Haynes, 2009. Analytical methods to assess nanoparticle toxicity. *Analyst* 134(3):425-439.
- Martins, P., V. Gomez, A. Lopes, C. Tavares, G. Botelho, S. Irusta & S. Lanceros-Mendez, 2014. Improving photocatalytic performance and recyclability by development of Er-doped and Er/Pr-codoped TiO₂/poly (vinylidene difluoride)-trifluoroethylene composite membranes. *The Journal of Physical Chemistry C* 118(48):27944-27953.
- Marvanová, L. & M. Laichmanová, 2007. *Subilisporea biappendiculata*, anamorph sp. nov. from Borneo (Malaysia) and a review of the genus. *Fungal Diversity* 26:241-256.
- Mathias, F. T., R. M. Romano & M. A. Romano, 2015. Avaliação dos Efeitos Toxicológicos e Ambientais de Nanopartículas de Sais de Prata. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada* 35(2):187-193.
- Maurer-Jones, M. A., K. C. Bantz, S. A. Love, B. J. Marquis & C. L. Haynes, 2009. Toxicity of therapeutic nanoparticles.
- McWilliams, A., 2006. Nanotechnology: A Realistic Market Assessment. BCC Research, July 2006.
- Medeiros, A., S. Duarte, C. Pascoal, F. Cássio & M. Graça, 2010. Effects of Zn, Fe and Mn on leaf litter breakdown by aquatic fungi: a microcosm study. *International Review of Hydrobiology* 95(1):12-26.
- Moore, E., 1996. Fundamentals of the fungi. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey 4:433-438.
- Moreirinha, C., S. Duarte, C. Pascoal & F. Cássio, 2011. Effects of cadmium and phenanthrene mixtures on aquatic fungi and microbially mediated leaf litter

- decomposition. *Archives of environmental contamination and toxicology* 61(2):211-219.
- Mueller, N. C. & B. Nowack, 2008. Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. *Environmental science & technology* 42(12):4447-4453.
- Navarro, E., A. Baun, R. Behra, N. B. Hartmann, J. Filser, A.-J. Miao, A. Quigg, P. H. Santschi & L. Sigg, 2008. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology* 17(5):372-386.
- Nel, A. E., L. Mädler, D. Velegol, T. Xia, E. M. Hoek, P. Somasundaran, F. Klaessig, V. Castranova & M. Thompson, 2009. Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. *Nature materials* 8(7):543-557.
- Niyogi, D. K., W. M. Lewis Jr & D. M. McKnight, 2002. Effects of stress from mine drainage on diversity, biomass, and function of primary producers in mountain streams. *Ecosystems* 5(6):554-567.
- Nogueira, P. F., I. M. M. Paino & V. Zucolotto, 2013. Nanosilver: Propriedades, aplicações e impactos na saúde pública e meio ambiente. *Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia* 1(4):59-71.
- Nohynek, G. J., J. Lademann, C. Ribaud & M. S. Roberts, 2007. Grey goo on the skin? Nanotechnology, cosmetic and sunscreen safety. *Critical reviews in toxicology* 37(3):251-277.
- Ober, C. A. & R. B. Gupta, 2011. Nanoparticle technology for drug delivery. *Idea Concyteg* 6(72):714-726.
- Oberdörster, G., 2010. Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. *Journal of internal medicine* 267(1):89-105.
- Ökte, A. N. & Ö. Yılmaz, 2008. Photodecolorization of methyl orange by yttrium incorporated TiO₂ supported ZSM-5. *Applied Catalysis B: Environmental* 85(1):92-102.
- Paoletti, M. G., 1999. Using bioindicators based on biodiversity to assess landscape sustainability. *Agriculture, ecosystems & environment* 74(1):1-18.
- Paschoalino, M. P., G. P. Marcone & W. F. Jardim, 2010. Os nanomateriais e a questão ambiental. *Química Nova*.
- Pascoal, C. & F. Cássio, 2004. Contribution of fungi and bacteria to leaf litter decomposition in a polluted river. *Applied and environmental microbiology* 70(9):5266-5273.
- Pascoal, C., F. Cássio & P. Gomes, 2001. Leaf breakdown rates: a measure of water quality?
- Pascoal, C., F. Cássio, A. Marcotegui, B. Sanz & P. Gomes, 2005a. Role of fungi, bacteria, and invertebrates in leaf litter breakdown in a polluted river. *Journal of the North American Benthological Society* 24(4):784-797.
- Pascoal, C., L. Marvanová & F. Cássio, 2005b. Aquatic hyphomycete diversity in streams of Northwest Portugal. *Fungal Divers* 19(10).
- Pascoal, C., M. Pinho, F. Cássio & P. Gomes, 2003. Assessing structural and functional ecosystem condition using leaf breakdown: studies on a polluted river. *Freshwater Biology* 48(11):2033-2044.
- Pastore, A., G. Federici, E. Bertini & F. Piemonte, 2003. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clinica chimica acta* 333(1):19-39.
- Pecora, R., 2013. *Dynamic light scattering: applications of photon correlation spectroscopy*. Springer Science & Business Media.
- Perugini, P., S. Simeoni, S. Scalia, I. Genta, T. Modena, B. Conti & F. Pavanetto, 2002. Effect of nanoparticle encapsulation on the photostability of the sunscreen agent,

- 2-ethylhexyl-p-methoxycinnamate. International journal of pharmaceutics 246(1):37-45.
- Pestana, J., A. Ré, A. Nogueira & A. Soares, 2007. Effects of Cadmium and Zinc on the feeding behaviour of two freshwater crustaceans: *Atyaephyra desmarestii* (Decapoda) and *Echinogammarus meridionalis* (Amphipoda). Chemosphere 68(8):1556-1562.
- Poole, C., F. Owens & 2003, Introduction to Nanotechnology, Hoboken.
- Powers, K. W., S. C. Brown, V. B. Krishna, S. C. Wasdo, B. M. Moudgil & S. M. Roberts, 2006. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials. Part VI. Characterization of nanoscale particles for toxicological evaluation. Toxicological Sciences 90(2):296-303.
- Pradhan, A., P. Geraldles, S. Seena, C. Pascoal & F. Cássio, 2015. Natural organic matter alters size-dependent effects of nanoCuO on the feeding behaviour of freshwater invertebrate shredders. Science of The Total Environment 535:94-101.
- Pradhan, A., P. Geraldles, S. Seena, C. Pascoal & F. Cássio, 2016a. Humic acid can mitigate the toxicity of small copper oxide nanoparticles to microbial decomposers and leaf decomposition in streams. Freshwater Biology 61(12):2197-2210.
- Pradhan, A., S. Seena, C. Pascoal & F. Cássio, 2011. Can metal nanoparticles be a threat to microbial decomposers of plant litter in streams? Microbial ecology 62(1):58-68.
- Pradhan, A., S. Seena, C. Pascoal & F. Cássio, 2012. Copper oxide nanoparticles can induce toxicity to the freshwater shredder *Allogamus ligonifer*. Chemosphere 89(9):1142-1150.
- Pradhan, A., C. O. Silva, C. Silva, C. Pascoal & F. Cássio, 2016b. Enzymatic biomarkers can portray nanoCuO-induced oxidative and neuronal stress in freshwater shredders. Aquatic Toxicology 180:227-235.
- Ramirez, C. A. O., 2010. Estudo por Microscopia Eletrônica de Transmissão de Alta Resolução de Nanopartículas de Hidroxiapatita e Hidroxiapatita Carbonatadas em diferentes Estágios de Cristalização. Tese de Doutorado em Física. Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas, RJ.
- Ramsden, C. S., T. J. Smith, B. J. Shaw & R. D. Handy, 2009. Dietary exposure to titanium dioxide nanoparticles in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): no effect on growth, but subtle biochemical disturbances in the brain. Ecotoxicology 18(7):939-951.
- Rand, G. M., 1995. Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment. CRC Press.
- Rand, G. M. & S. R. Petrocelli, 1985. Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications. FMC Corp., Princeton, NJ.
- Reddy, P. A. K., C. Manvitha, P. V. L. Reddy, V. D. Kumari & K.-H. Kim, 2016. Enhanced hydrogen production activity over BiOx–TiO₂ under solar irradiation: Improved charge transfer through bismuth oxide clusters. Journal of Energy Chemistry.
- Rossetto, A. L. d. O. F., 2012. Estudo comparativo entre os efeitos tóxicos agudos e crônicos do óxido de cobre na forma de nanopartícula e micropartícula.
- Ruot, B., A. Plassais, F. Olive, L. Guillot & L. Bonafous, 2009. TiO₂-containing cement pastes and mortars: measurements of the photocatalytic efficiency using a rhodamine B-based colourimetric test. Solar Energy 83(10):1794-1801.

- Sajjia, M., M. Oubaha, T. Prescott & A. Olabi, 2010. Development of cobalt ferrite powder preparation employing the sol-gel technique and its structural characterization. *Journal of Alloys and Compounds* 506(1):400-406.
- Salata, O. V., 2004. Applications of nanoparticles in biology and medicine. *Journal of nanobiotechnology* 2(1):1.
- Santos, A. B. K. d., 2008. Desinfecção de águas pelo processo fotocatalítico utilizando eletrodos térmicos de dióxido de titânio para inativação de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.
- Sato, Q. Z. Y. K. K. & K. N. N. K. K. Donaldson, 1998. Differences in the extent of inflammation caused by intratracheal exposure to three ultrafine metals: role of free radicals. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A* 53(6):423-438.
- Savolainen, K., U. Backman, D. Brouwer, B. Fadeel, T. Fernandes, T. Kuhlbusch, R. Landsiedel, I. Lynch & L. Pykkänen, 2013. Nanosafety in Europe 2015–2025: towards safe and sustainable nanomaterials and nanotechnology innovations. Finnish Institute of Occupational Health.
- SCENIHR, 2009. Risk Assessment of Products of Nanotechnologies In: Scientific Committee on Emerging and Newly and Health Risks. 9 de janeiro de 2009. http://ec.europa.eu/health/archive/ph_risk/committees/04_scenihhr/docs/scenihhr_o_023.pdf.
- Schmid, G., 2011. Nanoparticles: from theory to application. John Wiley & Sons.
- Schoenlein-Crusius, I. & E. Malosso, 2007. Diversity of Aquatic Hyphomycetes in the tropics. *Fungi: multifaceted microbes* Anamaya Publishers, New Delhi 27:61-81.
- Schoenlein-Crusius, I. H. & R. A. P. Grandi, 2003. The diversity of aquatic hyphomycetes in South America. *Brazilian Journal of Microbiology* 34(3):183-193.
- Schoenlein-Crusius, I. H., C. G. Moreira & D. D. C. Bicudo, 2009. Aquatic Hyphomycetes in the Parque Estadual das Fontes do Ipiranga-PEFI, São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Botany* 32(3):411-426.
- Schwab, F., T. D. Bucheli, L. P. Lukhele, A. Magrez, B. Nowack, L. Sigg & K. Knauer, 2011. Are carbon nanotube effects on green algae caused by shading and agglomeration? *Environmental science & technology* 45(14):6136-6144.
- Scown, T. M., E. M. Santos, B. D. Johnston, B. Gaiser, M. Baalousha, S. Mitov, J. R. Lead, V. Stone, T. F. Fernandes & M. Jepson, 2010. Effects of aqueous exposure to silver nanoparticles of different sizes in rainbow trout. *Toxicological Sciences* 115(2):521-534.
- Scown, T. M., R. van Aerle, B. D. Johnston, S. Cumberland, J. R. Lead, R. Owen & C. R. Tyler, 2009. High doses of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles accumulate in the kidneys of rainbow trout but with no observable impairment of renal function. *Toxicological Sciences* 109(2):372-380.
- Seitz, L., H. Mohr, R. Burroughs & D. Sauer, 1977. Ergosterol as an indicator of fungal invasion in grains. *Cereal Chemistry*.
- Seitz, L., D. B. Sauer, R. Burroughs, H. Mohr & J. Hubbard, 1979. Ergosterol as a measure of fungal growth [*Alternaria* and *Aspergillus*, in cereal grains]. *Phytopathology* (USA).
- Sheng, G.-P., M.-L. Zhang & H.-Q. Yu, 2008. Characterization of adsorption properties of extracellular polymeric substances (EPS) extracted from sludge. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 62(1):83-90.
- Sies, H., 1999. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biology and Medicine* 27(9):916-921.

- Soenen, S. J., P. Rivera-Gil, J.-M. Montenegro, W. J. Parak, S. C. De Smedt & K. Braeckmans, 2011. Cellular toxicity of inorganic nanoparticles: common aspects and guidelines for improved nanotoxicity evaluation. *Nano Today* 6(5):446-465.
- Sridhar, K., F. Bärlocher, G. J. Krauss & G. Krauss, 2005. Response of aquatic hyphomycete communities to changes in heavy metal exposure. *International review of hydrobiology* 90(1):21-32.
- Suberkropp, K., 1984. Effect of temperature on seasonal occurrence of aquatic hyphomycetes. *Transactions of the British Mycological Society* 82(1):53-62 doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0007-1536\(84\)80211-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0007-1536(84)80211-9).
- Suberkropp, K., 1998. Effect of dissolved nutrients on two aquatic hyphomycetes growing on leaf litter. *Mycological Research* 102(08):998-1002.
- Tai, P., Q. Zhao, D. Su, P. Li & F. Stagnitti, 2010. Biological toxicity of lanthanide elements on algae. *Chemosphere* 80(9):1031-1035.
- Thomas, K., 1996. Freshwater fungi. *Fungi of Australia Australian Biological Resources*, Canberra:1-37.
- Wang, C., A. D. Bobba, R. Attinti, C. Shen, V. Lazouskaya, L.-P. Wang & Y. Jin, 2012. Retention and transport of silica nanoparticles in saturated porous media: effect of concentration and particle size. *Environmental science & technology* 46(13):7151-7158.
- Ward, J. E. & D. J. Kach, 2009. Marine aggregates facilitate ingestion of nanoparticles by suspension-feeding bivalves. *Marine Environmental Research* 68(3):137-142.
- Warne, M. S. J. & A. Schifko, 1999. Toxicity of laundry detergent components to a freshwater cladoceran and their contribution to detergent toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 44(2):196-206.
- Weete, J. D. & J. L. Laseter, 1974. Distribution of sterols in the fungi I. Fungal spores. *Lipids* 9(8):575-581.
- Weller, M. T., 1994. *Inorganic Materials Chemistry*. Oxford University Press.
- Wijnhoven, S., S. Dekkers, M. Kooi, R. Jongeneel & W. de Jong, 2011. Nanomaterials in consumer products: Update of products on the European market in 2010. RIVM rapport 340370003.
- Xiong, D., T. Fang, L. Yu, X. Sima & W. Zhu, 2011. Effects of nano-scale TiO₂, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage. *Science of the Total environment* 409(8):1444-1452.
- Yeo, M.-K. & S.-W. Pak, 2008. Exposing zebrafish to silver nanoparticles during caudal fin regeneration disrupts caudal fin growth and p53 signaling. *Molecular and Cellular Toxicology* 4(4):311-317.
- Zar, J. H., 2009. *Biostatistical Analysis*, 5th. Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River.
- Zhang, F., X. Wu, Y. Chen & H. Lin, 2009. Application of silver nanoparticles to cotton fabric as an antibacterial textile finish. *Fibers and Polymers* 10(4):496-501.
- Zhang, Z., G. Yang, J. Wei, H. Bian, J. Gao, J. Li & T. Wang, 2016. Morphology and magnetic properties of CoFe₂O₄ nanocables fabricated by electrospinning based on the Kirkendall effect. *Journal of Crystal Growth* 445:42-46 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2016.04.012>.
- Zhu, X., Y. Chang & Y. Chen, 2010. Toxicity and bioaccumulation of TiO₂ nanoparticle aggregates in *Daphnia magna*. *Chemosphere* 78(3):209-215.
- Zhu, X., L. Zhu, Y. Chen & S. Tian, 2009. Acute toxicities of six manufactured nanomaterial suspensions to *Daphnia magna*. *Journal of Nanoparticle Research* 11(1):67-75.